



Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose

Joana Sanches Roque de Carvalho

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Beirão da Costa

Co-Orientador: Professora Doutora Margarida Moldão Martins

Júri:

Presidente: Doutor Raul Filipe Xisto Bruno de Sousa, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor José Carlos de Carvalho Rodrigues, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical;

Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda, empenho e entusiasmo de muitas pessoas. Embora correndo o risco de omissão, quero deixar aqui expressos os meus agradecimentos:

À Senhora Professora Doutora Eng.^a Maria Luísa Beirão da Costa, da ISA, pela sugestão do tema e orientação deste trabalho, mas também pela completa disponibilidade, entusiasmo, exigência e rigor científicos colocados ao longo de todas as etapas do trabalho.

À Senhora Professora Doutora Eng.^a Margarida Moldão Martins, da ISA, igualmente pela co-orientação deste trabalho.

À senhora Professora Doutora Ivonne Delgadillo do Departamento de Química da Universidade de Aveiro pela realização da análise de FTIR.

Ao senhor Professor Doutor António Vicente do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela realização dos campos de difusão e microscopia confocal de fluorescência.

Ao Senhor Octávio Chaveiro pela execução da microscopia electrónica de varrimento.

À Doutora Eng.^a Sara Beirão da Costa pelo apoio prestado na interpretação dos resultados da análise de FTIR.

À Eng.^a Cláudia Duarte pelo apoio prestado durante a execução prática deste trabalho.

A todo o pessoal técnico do DAIAT e em especial à Rosário, pelo apoio, alegria e boa disposição.

A todos os meus amigos e colegas que me acompanharam ao longo destes anos e que me proporcionaram momentos agradáveis e inesquecíveis, em particular à Cláudia Henriques, Davide Duarte, Diana Fernandes, Mariana Pereira, Rute Coutinho e Sandra Balbi.

A toda a minha família pelo apoio que me concederam em todas as etapas da minha vida.

E por último, aos meus pais e irmão, que sempre me encorajaram e cujo amor, dedicação e amizade estiveram sempre presentes.

RESUMO

Os óleos essenciais (OE) em geral e o de orégão (*Origanum virens* L.) em particular são geralmente muito instáveis. Assim, pretendeu-se com o presente trabalho estudar a potencialidade do encapsulamento de OE de orégão em matrizes obtidas a partir de sistemas de gelatina/sacarose, por atomização e liofilização.

Foram utilizadas várias técnicas analíticas (SEM, microscopia confocal de fluorescência, FTIR e Difusão) para a avaliação morfológica dos encapsulados e detecção da presença do OE nas matrizes.

No caso dos encapsulados por atomização, foi ainda analisado o tamanho médio das partículas que com maior frequência apresentaram tamanhos entre 0,9 e 10 μm .

Os encapsulados por atomização apresentavam-se na forma de cápsulas lisas e esféricas, enquanto os obtidos por liofilização não apresentavam forma ou estrutura definida.

A presença de OE nos encapsulados foi corroborada por análise FTIR e microscopia Confocal de fluorescência.

Verificou-se que os encapsulados obtidos por atomização apresentaram um baixo valor de coeficiente de difusão ($\approx 10^{-15} \text{m}^2/\text{s}$) e que, durante as primeiras duas horas, libertavam maior quantidade de OE (0,2 a 0,4 mg) do que os encapsulados por liofilização (0,025 a 0,2 mg).

O encapsulamento de OE de orégão em sistemas gelatina/sacarose através da atomização ou da liofilização pode constituir um processo viável.

Palavras-chave: orégão, gelatina, sacarose, encapsulamento, atomização, liofilização.

ABSTRACT

The essential oils (EO) in general and of oregano (*Origanum virens L.*) in particular are usually very unstable. Thus, the present study intends to study the potential of encapsulation of EO on matrices obtain from gelatin/sucrose systems, by spray-drying and freeze-drying.

Several analytical techniques (scanning electron microscopy, confocal fluorescence microscopy, FTIR and diffusion) were used for morphological evaluation of the encapsulated and the presence of EO in the matrices.

In the case of encapsulation by spray-drying, size average particles were also considered, witch, with more frequency, presented sizes between 0.9 and 10 micrometers.

The spray-drying encapsulated were smooth and spherical capsules, while those obtained by freeze-drying had no shape or defined structure.

The EO presence in the encapsulated was confirmed by FTIR and confocal fluorescence microscopy analysis.

It was found that the encapsulated obtained by the spray-drying process had a low value of diffusion coefficient ($\approx 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$) and that during the first two hours, the release of EO was greater (0.2 to 0.4 mg) of those encapsulated by freeze drying (0.025 to 0.2 mg).

The encapsulation of oregano EO on gelatin/sucrose systems through spray-drying or freeze-drying can be a viable process.

Key-words: encapsulation, spray-drying, freeze-drying, oregano, gelatin, sucrose.

EXTENDED ABSTRACT

The aromatic plants are used in various industries including food, pharmaceutical and cosmetic as flavoring agents and/or anti-oxidants. On one hand, there is a growing interest, by the consumer, for food safety, on another the interest for the development of dietetic food in which the use of aromatic plants or their compounds may compensate the absence of certain ingredients harmful to health, such as salt and sugar.

Because of the seasonality of most of these plants, it is necessary to find methods that can provide the consumer, for more extended periods, safer products, capable of replacing the plant and keeping its original properties.

Extracts of aromatic plants are composed of volatile and non volatile. The volatile compounds are chemically unstable in the presence of air, light or when exposed to high temperatures. As such it is necessary to preserve the aromatic compounds to prevent or minimize such changes. The encapsulation is one of the possible technologies that lead to this stabilization. This technique allows that, aroma compounds be preserved on inert medium (the matrix), slowing the loss of volatiles and enabling the release in more convenient time.

Given the chemical, morphological and functional properties of gelatin and sucrose, they present themselves as potential agents of essential oil (EO) encapsulation. Therefore, the aim was to study the possibility of producing encapsulating matrices from gelatin/sucrose systems at different concentrations, and assess the ability of capsule formation by spray-drying and freeze-drying under various conditions. The resulting matrices were morphologically characterized by scanning electron microscopy and particle size. Using the method of response surface (RSM) the influence of processing conditions on those features were evaluated.

It was possible to obtain matrices from spray-drying, regardless the gelatin/sucrose system used (20:80, 60:40 and 100% of gelatin). The resulting matrices were spherical and smooth capsules. In the case of capsules obtained with concentrations of gelatin and sucrose of 20:80, the capsules formed aggregates. Regardless the concentrations of the gelatin/sucrose systems and the conditions used, the average size are more frequent for sizes between 0.9 and 10 micrometers. The encapsulating matrix obtained by freeze drying, had no structure or shape.

To study the capacity of EO encapsulation in matrices, oregano essential oil was added.

Various techniques were used (scanning electron microscopy, confocal fluorescence microscopy, FTIR, diffusion) for morphological evaluation of encapsulated and detection not only the presence of EO in the matrix, but also possible interactions between matrix components and EO as well as the kinetics of his release.

The results showed that the gelatin/sucrose systems have potentiality to encapsulate oregano oil, despite of the applied method. This finding was essentially confirmed by confocal fluorescence microscopy, FTIR and essential oil diffusion analysis.

Capsules containing EO showed average sizes smaller than those obtained by their analogous without EO. It was found that, for capsules without EO, the concentration of gelatin and sucrose, the soluble solids content and drying temperature influenced the average size of particles, and the most influential variable was the concentration of gelatin and sucrose. In capsules with EO, the influence of temperature on average particle size was not significant, and the soluble solids content was the variable with the greatest influence on the average size of the encapsulated. These differences suggest a strong interaction between the oil and matrix components.

Through the analysis of encapsulated (spray-drying and freeze-drying) by confocal fluorescence microscopy, regardless the encapsulating method, gelatin/sucrose systems or conditions used, it was possible to verify the presence of oil uniformly on the matrices. These results corroborate the previously noted with regard to particle size formed.

For FTIR analysis, differences between the capsules produced by atomization according to the different concentrations of gelatin and sucrose, soluble solids content, drying temperature and the presence of EO were confirmed. It was found that for different soluble solids, these differences are more evident for capsules with EO, which may be due to the way oil is found in the capsule. For drying temperature of 190°C, the differences between capsules with and without EO was much attenuated, which may indicate a degradation/loss of EO at higher temperatures. Matrices obtained by freeze drying showed differences depending on different concentrations of gelatin and sucrose and the presence of EO. These results indicate that the process of freeze drying and spray-drying was effective to retain the active compound.

It was found that the spray-drying encapsulates showed a low value of diffusion coefficient ($\approx 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$), which may be due to the high solubility of gelatin and sucrose in aqueous solutions, resulting in a rapid release of essential oil of oregano. However in some systems, gelatin and sucrose, especially for systems of gelatin and sucrose concentrations of 20:80, it was not possible to determine the diffusion coefficient, possibly because these systems form

agglomerates. It was also found that the amount of oil released in the first two hours is greater for systems of gelatin of 100% and soluble solids content of 10%.

For the encapsulated obtained by spray-drying the amount of essential oil released in the first two hours is higher for systems with gelatin and sucrose concentrations of 60:40 and soluble solids content of 10%.

Comparing the two methods of encapsulation by EO diffusion, in the first two hours, the encapsulated produced by the spray-drying release greater amount of oil (0.2 to 0.4 mg) than those encapsulated by freeze-drying (0.025 to 0.2 mg).

In conclusion, encapsulation of oregano essential oil in gelatin/sucrose systems by spray-drying or freeze-drying can be a viable process.

Key-words: encapsulation, spray-drying, freeze-drying, oregano, gelatin, sucrose.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
EXTENDED ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - ÓLEO ESSENCIAL DE OREGÃO	2
1. Objectivos do Capítulo	2
2. Plantas Aromáticas	2
3. Orégão	4
3.1. Óleo Essencial de Orégão	5
3.2. Extracção de Óleos Essenciais	8
3.2.1. Métodos de Extracção	9
4. Obtenção de Óleo Essencial de Orégão	10
CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE MATRIZES ENCAPSULANTES.....	11
1. Objectivo do Capítulo.....	11
2. Matrizes Encapsulantes	11
2.1. Materiais Encapsulantes	14
2.1.1. Glúcidos	14
2.1.1.1. Goma Arábica	14
2.1.1.2. Amidos	14
2.1.1.3. Maltodextrinas	15
2.1.1.4. Sacarose	15
2.1.2. Proteínas	16

2.1.3. Gelatina	16
3. Encapsulamento	16
4. Métodos de encapsulamento	18
4.1. Atomização	18
4.1.1. “Spray-drying”	18
4.1.2. “Spray-Cooling” e “Spray-Chilling”	21
4.2. Liofilização	22
4.3. Leito Fluidizado	24
4.4. Extrusão	24
4.5. Coacervação	25
4.6. Complexação por inclusão – ciclodextrinas	27
4.7. Liposomas	27
5. Materiais e Métodos.....	28
5.1. Materiais.....	28
5.2. Métodos de Produção da Matriz Encapsulante.....	29
5.2.1. Atomização	29
5.2.2. Liofilização	30
5.3. Métodos de Análise.....	31
5.3.1.1. Microscopia Electrónica de Varrimento.....	31
5.3.1.2. Tamanho de Partícula	31
5.4. Resultados e Discussão	32
5.4.1. Caracterização da Matriz Encapsulante obtida por Atomização.....	32
5.4.1.1. Caracterização Morfológica	32
5.4.2. Caracterização da matriz encapsulante obtida por liofilização	38
5.4.2.1. Caracterização morfológica	39
CAPÍTULO IV – ENCAPSULAMENTO E LIBERTAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE OREGÃO	40
1. Objectivos do Capítulo	40
2. Libertação do Óleo Essencial encapsulado	40

3. Materiais e Métodos.....	41
3.1. Materiais.....	41
3.2. Métodos de produção dos encapsulados	41
3.3. Métodos de análise	42
3.3.1. Microscopia Confocal de fluorescência	42
3.3.2. Espectroscopia de infravermelhos médio com transformações de Fourier.....	42
3.3.3. Difusão do Óleo Essencial de Orégão	43
3.4. Resultados e Discussão	44
3.4.1. Caracterização dos Encapsulados Produzidos por Atomização.....	44
3.4.1.1. Caracterização Morfológica	45
3.4.1.2. Microscopia Confocal de Fluorescência	49
3.4.1.3. Análise de FTIR.....	51
3.4.1.4. Difusão do Óleo Essencial Encapsulado	58
3.4.2. Caracterização de Encapsulados Produzidos por Liofilização.....	63
3.4.2.1. Caracterização Morfológica	63
3.4.2.2. Microscopia Confocal de Fluorescência	64
3.4.2.3. Análise de FTIR.....	65
3.4.2.4. Difusão do Óleo Essencial de Orégão	68
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do aparelho de destilação por arrastamento de vapor	10
Figura 2 - Atomizador (“spray-dryer”) Lab-Plant modelo SD 05, Huddersfield, e pormenor do jacto atomizador.....	20
Figura 3 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulante com concentração de 20% gelatina e 80% sacarose.....	33
Figura 4 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulada com concentração de 60% gelatina e 40% sacarose.....	34
Figura 5 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulante com concentração de 100% gelatina	35
Figura 6 – Microcápsulas de gelatina, secção de uma cápsula rebentada.....	36
Figura 7 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes TSS e Temperatura.....	37
Figura 8 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes % Gelatina e Temperatura.....	37
Figura 9 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes TSS e % Gelatina.....	38
Figura 10 - Amostra de liofilizado da matriz encapsulante	39
Figura 11 – Imagens obtidas por SEM das amostras da matriz encapsulante liofilizadas.....	39
Figura 12 - a) Reactor com camisa utilizado para avaliar a difusão do óleo essencial de orégão; b) Esquema ilustrativo.....	44
Figura 13 - Histogramas da distribuição dos diâmetros dos encapsulados com concentração de gelatina de 20%e sacarose 80%	45
Figura 14 - Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas de gelatina (60%) e sacarose (40%) encapsuladas	46
Figura 15 - Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas de gelatina (100%) encapsuladas	47
Figura 16 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes % Gelatina e TSS.....	48
Figura 17 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 60% de gelatina, 40% de sacarose, 10% de TSS, 155°C.....	49

Figura 18 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 20% de gelatina, 80% de sacarose, 7,5% de TSS, 155°C.....	50
Figura 19 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 100% de gelatina, 7,5% de TSS, 155°C.....	50
Figura 20 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 60% de gelatina, 40% de sacarose, 7,5% de TSS, 120°C.....	50
Figura 21 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (95%) e PC2 (4%) em função de diferentes concentrações de gelatina e sacarose e presença de OE	52
Figura 22 – Contribuição factorial da componente principal PC1 na análise das matrizes em função de diferentes concentrações de gelatina e sacarose	53
Figura 23 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (63%) e PC2 (26%) em função da presença de OE	54
Figura 24 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (78%) e PC2 (15%) em função dos teores de sólidos solúveis e presença de óleo essencial.....	55
Figura 25 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (63%) e PC3 (2,8%) em função dos teores de sólidos solúveis e presença de óleo essencial.....	55
Figura 26 - Contribuição factorial da componente principal PC2 em função da presença de OE	56
Figura 27 – Projecção da amostra no espaço definido PC1 (81%) e PC2 (17%) em função da influência da temperatura e presença de OE	57
Figura 28 – Contribuição factorial da componente principal PC1 em função da temperatura de secagem	57
Figura 29 - Cinética de libertação de óleo essencial de orégão através de micropartículas de gelatina/sacarose com diferentes composições, a 25 °C.....	58
Figura 30 - Cinética de libertação de óleo essencial de orégão obtida através da Equação 1 e Equação 2, de partículas de gelatina com diferentes composições, a 25 °C.....	60
Figura 31 - Cinética de libertação de óleo essencial de orégão de nanopartículas de gelatina com diferentes composições, a 25 °C.....	61
Figura 32 - Amostras de liofilizado da matriz encapsulante.	63
Figura 33 - Imagens obtidas por SEM das amostras dos encapsulados liofilizados.....	63
Figura 34 – Imagens captadas para os liofilizados com 20% de gelatina, 80% de sacarose e 7,5% de TSS	64
Figura 35 - Imagens captadas para os liofilizados com 100% de gelatina e 7,5% de TSS....	64

Figura 36 – Projecção das amostras no espaço definido de PC1 (90%) e PC2 (4,6) na análise das matrizes liofilizadas em função das diferentes concentrações de gelatina e presença de OE	66
Figura 37 – Contribuição factorial da componente PC1 na análise das matrizes liofilizadas em função das diferentes concentrações de gelatina e sacarose.....	67
Figura 38 - Contribuição factorial da componente PC2 em função da presença de OE.	67
Figura 39 – a) Cinética de libertação de óleo essencial de orégão através da matriz com diferentes composições. b) Efeito dos sólidos totais sólúveis na cinética de libertação de óleo essencial de orégão através da matriz com 20 % gelatina. c) Efeito dos sólidos totais sólúveis na cinética de libertação de óleo essencial de orégão através da matriz com 100 % gelatina. d) Efeito dos sólidos totais sólúveis na cinética de libertação de óleo essencial de orégão através da matriz com 60 % gelatina.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do óleo essencial de <i>Origanum virens</i> L.	7
Tabela 2 - Exemplos de materiais utilizados em matrizes	13
Tabela 3 – Delineamento experimental para a obtenção de matrizes a produzir por atomização	29
Tabela 4 - Delineamento experimental para a obtenção de matrizes por liofilização	30
Tabela 5 – Nomenclatura das variáveis em estudo para a análise multivariada.	51
Tabela 6 - Coeficiente de difusão obtidos para a libertação controlada de óleo de orégão através de diferentes composições de partículas, a 25 °C	62
Tabela 7 – Nomenclatura das variáveis em estudo para a análise multivariada.	65

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas encontram utilização em diversas indústrias incluindo a alimentar, farmacêutica e cosmética como aromatizantes e/ou anti-oxidantes. Por um lado, assiste-se a um crescente interesse, do consumidor, na segurança alimentar e por outro, ao desenvolvimento de produtos dietéticos em que, pelo uso de plantas aromáticas ou dos seus compostos se procura compensar a ausência de alguns ingredientes, nocivos à saúde, nomeadamente o sal e o açúcar.

Devido ao carácter sazonal da maior parte das plantas aromáticas torna-se necessário encontrar metodologias que disponibilizem ao consumidor, durante períodos mais alongados, produtos seguros, capazes de substituir a planta em fresco e mantendo as propriedades originais.

O consumidor actual, com novas necessidades e exigências pressionou no sentido da intensificação de pesquisa e desenvolvimento de alimentos e ingredientes naturais, onde os aromas se incluem.

A componente aromática das plantas é constituída por compostos voláteis e não voláteis. Os compostos voláteis são quimicamente instáveis na presença de ar, luz ou quando expostos a temperaturas elevadas. Como tal torna-se necessário preservar os compostos aromáticos de forma a impedir ou minimizar as referidas alterações. O encapsulamento é uma das tecnologias possíveis conducentes a esta estabilização. Esta técnica permite que compostos do aroma sejam preservados numa base inerte (a matriz), retardando a perda de compostos voláteis e possibilitando a libertação na altura mais conveniente. O presente trabalho visa a obtenção de encapsulados de aroma de orégão. Para tal foram testados dois processos de secagem e encapsulamento, a saber a atomização e a liofilização.

Atendendo às propriedades químicas, morfológicas e funcionais da gelatina e da sacarose, estes apresentam-se como potenciais agentes de encapsulamento do aroma de plantas aromáticas.

Assim, utilizando os processos já referidos procedeu-se ao estudo da potencialidade do encapsulamento do aroma de *Origanum virens* L. através dessas metodologias, em matrizes de gelatina e gelatina/sacarose.

CAPÍTULO II - ÓLEO ESSENCIAL DE OREGÃO

1. Objectivos do Capítulo

É objectivo deste capítulo descrever de forma sucinta a importância das plantas aromáticas e do orégão em particular, o óleo essencial de orégão e o seu método de extracção por hidrodestilação.

2. Plantas Aromáticas

Desde há muito que o Homem usa plantas aromáticas. A utilização de condimentos e de plantas aromáticas terá sido transmitida culturalmente, através de gerações. Por exemplo, o uso de plantas aromáticas e especiarias não é tão evidente nos países de climas frios, como os do Norte da Europa. Este facto está intimamente relacionado com as propriedades antimicrobianas das plantas aromáticas, que eram utilizadas também na conservação de alimentos nos países de temperatura mais elevada onde, ao contrário dos países frios, se reuniam condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano.

As plantas aromáticas podem ser utilizadas de diversas formas: em fresco, secas ou através de extractos nomeadamente dos seus óleos essenciais. São utilizadas como ingredientes de alimentos e bebidas alcoólicas, em farmácia, perfumaria, cosmética, como corantes e ainda como plantas ornamentais.

Inicialmente os óleos essenciais seriam utilizados para fins medicinais, tendo posteriormente desenvolvido o seu campo de actuação como ingredientes de substâncias aromatizantes. Estes têm aplicação em diversos produtos dos quais se salientam os lacticínios, molhos, sobremesas, sopas, carnes, bebidas, alimentos para animais, medicamentos, entre outros.

Nos alimentos são utilizadas para conferir aroma, gosto, pungência e cor. Também apresentam propriedades anti-oxidantes e antimicrobianas. Além destes efeitos directos conhecidos, a utilização de plantas aromáticas e especiarias pode contribuir para a redução de sal e açúcar e prevenção da deterioração dos alimentos.

A indústria dos aromatizantes alimentares encontra-se condicionada a factores como:

- A constante procura de aromas com características que os tornem mais saudáveis, pois os consumidores são cada vez mais exigentes considerando artificiais, sintéticos ou químicos aromas que inicialmente eram bem aceites. Deste modo a indústria é levada a procurar e utilizar fontes naturais de aromas.
- Alterações ambientais, pois as principais fontes de matéria-prima podem tornar-se insuficientes face à intensificação da procura.
- O avanço na tecnologia dos alimentos visto que a indústria dos aromatizantes é a principal fornecedora da indústria alimentar.
- Os custos de energia e a viabilidade económica de todo o projecto.

É na forma de aromatizantes e/ou antioxidantes que as plantas aromáticas são preferencialmente utilizadas na indústria alimentar. Chang (1973) apresenta várias vertentes na investigação relacionada com os aromas:

- Melhorar os rendimentos de extracção dos compostos aromáticos ou eliminar aromas desagradáveis presentes em alguns alimentos;
- Estabelecer um controlo do aroma nos produtos alimentares a partir da especificação dos atributos aromáticos dos alimentos e dos aromatizantes;
- A possibilidade de criação de novos produtos com um perfil aromático mais aceitável para o consumidor.

3. Orégão

O orégão (*Origanum virens* L.) é uma espécie vivaz, com elevado polimorfismo. Possui caules erectos, as folhas são pequenas, ovais de cor verde-claro e com pubescência na página inferior. As flores de orégão são brancas ou violáceas. Já era utilizado na Roma antiga como planta culinária e medicinal e era também considerada um símbolo de paz e felicidade. No antigo Egipto o pó de orégão utilizava-se como desinfectante e conservante. O seu nome deriva de dois vocábulos gregos, *oros* (montanha) e *ganos* (alegria) e “significa esplendor da montanha” pela beleza que confere aos lugares onde cresce.

O orégão é uma das plantas aromáticas mais apreciadas. É utilizado numa multiplicidade de produtos alimentares sendo utilizados como condimentos pelas populações da região mediterrânea desde tempos remotos. Actualmente, a sua utilização condimentar, na forma de folhas frescas ou secas, acompanha a expansão e internacionalização de culinária mediterrânea, em particular a italiana. Conjuntamente com a pimenta preta é um ingrediente comum de saladas e um bom substituto do sal (Kintzios, 2004).

Para além da utilização condimentar, os orégãos podem ser utilizados em fitoterapia. A parte aérea florida e o óleo essencial são rico em compostos fenólicos, com predomínio para o timol e carvacrol. Os orégãos são ainda ricos em flavanóides. As preparações de orégãos possuem propriedades antitússicas e acção colagoga, carminativa e anti-espasmódica. O carvacrol e o timol são anti-bacterianos e anti-fúngicos conferindo propriedades anti-sépticas aos extractos. As formulações são administradas para uso interno em situações de perda de apetite, dispepsia, flatulência e cólicas.

Os óleos essenciais de orégão são muito utilizados como um componente aromático em sabonetes, colónias e perfumes, especialmente fragrâncias para homens. São também utilizados como agentes aromáticos, principalmente em carnes, molhos e pizzas. As folhas e os seus extractos possuem actividade anti-microbiana, devida principalmente à fracção dos óleos essenciais. Sivropoulou *et al* (2006) reportou que o óleo essencial de orégão contém níveis elevados de actividade anti-microbiana contra estirpes de bactérias gram+ e gram-. Contêm antioxidantes que podem proteger os óleos essenciais da oxidação durante o armazenamento.

3.1. Óleo Essencial de Orégão

Certas plantas têm a capacidade de sintetizar substâncias odoríferas, também designadas de óleos essenciais ou compostos de aroma, responsáveis pelo cheiro e gosto na planta. Os óleos essenciais são metabolitos secundários resultantes da secreção de glândulas epidérmicas especializadas, tricomas, ou de pêlos cuticulares das plantas aromáticas (Langenheim, 1982). A sua posterior libertação ocorre por evaporação através da camada da cutícula.

De acordo com Chang e Jacobs (1988), os compostos dos aromas são relativamente voláteis e geralmente são térmica e quimicamente instáveis em natureza. Estão sujeitos à oxidação, isomerização e polimerização e interagem facilmente com outros componentes voláteis, alimentos e embalagens. Desta forma poderão sofrer um decréscimo da intensidade do aroma e contribuir para o desenvolvimento de aromas estranhos. Por conseguinte, a sua retenção numa matriz sólida, inócua e de origem alimentar, irá facilitar a sua manipulação, assim como a preservação dos seus constituintes durante um maior período de tempo, evitando que ocorram alterações indesejáveis promotoras na maioria dos casos de aroma desagradáveis.

Os aromas podem ser obtidos de produtos naturais ou sintetizados mas são os naturais os preferidos. Quando os aromas estão a ser desenvolvidos é necessário ter em conta a compatibilidade entre o novo aroma e o aroma inerente ao produto, onde o novo aroma será introduzido.

O sabor e o aroma dos orégãos são devidos sobretudo aos óleos essenciais que este contém. Os compostos do aroma podem ser obtidos através de destilação de folhas, flores, frutos e caules (Langenheim, 1982) ou utilizando outros métodos de extracção, como por exemplo extracção com solventes ou por acção da pressão.

O óleo essencial apresenta-se no estado líquido à temperatura ambiente. É solúvel em substâncias lipídicas, insolúvel em água e emulsionável em suspensões. É composto de centenas de compostos orgânicos embora muitos estejam presentes numa quantidade muito pequena e não existem mais de quatro ou cinco componentes em quantidades substanciais. A sua composição é distinta de espécie para espécie, de planta produtora, influenciada pelo local onde se desenvolveu, assim como pelo estágio do seu ciclo de vida, apresentando multiplicidade de quimiótipos.

De acordo com Heath (1981) o óleo essencial de orégão contém:

- Terpenos
- Derivados oxigenados dos terpenos
- Compostos aromáticos contendo uma estrutura benzénica e
- Compostos contendo azoto e enxofre

Os terpenos

Os terpenos são os produtos resultantes da fusão de duas ou mais unidades isoprénicas C_5H_8 , sendo que a fórmula geral dos terpenos é $(C_5H_8)_n$, quando n é igual a dois, os respectivos hidrocarbonetos são conhecidos como monoterpenos ou simplesmente terpenos; quando n é igual a três são chamados sesquiterpenos e quando n é igual a quatro, diterpenos.

Embora os hidrocarbonetos terpénicos sejam quantitativamente importantes na composição de muitos óleos essenciais, contribuem pouco para o aroma, contribuindo sobretudo com “frescura” para o perfil sensorial.

Derivados oxigenados dos terpenos

Estes compostos ocorrem em proporções elevadas nalguns óleos essenciais, sendo os principais constituintes dos aromas característicos das plantas aromáticas. Os derivados oxigenados dos hidrocarbonetos terpénicos incluem álcoois (por exemplo, linalol e α -terpineol), aldeídos, cetonas e ésteres. Ocorrem largamente nos óleos essenciais e contribuem de forma marcada para as características sensoriais (Heath, 1981).

Compostos benzénicos

Os compostos aromáticos contendo o anel benzénico formam outro grupo importante de componentes dos aromas. Incluem uma gama completa de grupos funcionais como álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, lactonas, etc. (Heath, 1981).

Compostos com azoto ou enxofre

Os compostos orgânicos contendo azoto ou enxofre, não sendo constituintes dos óleos essenciais propriamente ditos, muitas vezes são extraídos em simultâneo. Exemplos são o amoníaco, a trimetilamina, o ácido cianídrico e o sulfureto de hidrogénio (Heath, 1981).

Na Tabela 1 está representada a composição de um óleo essencial de orégão produzido em Trás-os-Montes.

Tabela 1 - Composição do óleo essencial de *Origanum virens* L. (Fonte: Ribeiro, 2007)

Composto	Percentagem	Composto	Percentagem
α -Tujeno	0,3	Borneol	0,6
α -Pino	0,8	Terpineno-4-ol	0,8
Canfeno	0,2	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	V
Oct-1-en-3-ol	0,5	<i>trans</i> - Dihidrocarvona	0,1
3-Octanona	0,2	α -Terpineol	1,8
β -Pino	0,1	Carvacril-metil óxido	0,5
β -Mirceno	1,8	Timol	2,5
α -Felandreno	0,2	Carvacrol	66,4
Δ -3-Careno	0,1	β -Bourbuneno	V
α -Terpineno	1,5	<i>E</i> -Cariofileno	1,5
<i>p</i> -Cimeno	9,7	α -Humuleno	0,2
Limoneno	0,3	γ -Muroleno	0,1
β -Felandreno	0,3	β -Bisaboleno	0,5
<i>Z</i> - β -Ocimeno	0,1	γ -Cadineno	V
<i>E</i> - β -Ocimeno	0,2	δ -Cadineno	0,1
γ -Terpineno	5,4	Componentes agrupados	
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,3	Monoterpenos hidrocarbonetos	21,0
Terpinoleno	0,2	Monoterpenos oxigenados	74,1
Linalol	1,1	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	2,5
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	0,1	Outros compostos	0,7

V= vestígios (<0,05%).

3.2. Extracção de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram inicialmente usados com propósitos medicinais e só mais tarde desenvolvidos como agentes aromáticos.

Dependendo da planta, a extracção deve considerar alguns factores:

- Algumas plantas devem ser usadas frescas; quando envelhecem perdem os seus componentes aromáticos, e por isso tornam-se inutilizáveis.
- As quantidades necessárias de matéria-prima para obter o aroma desejado serão drasticamente reduzidas após selecção cuidadosa.
- Contaminações bacterianas devem ser totalmente eliminadas.
- O controlo da qualidade do produto deve ser simples e o produto deve ter qualidade uniforme de lote a lote.

De acordo com Forss (1969), Howlett (1972) *citado em* Ferreira *et al* (1998) e Chang (1973) para o desenvolvimento de um aroma desejável deve existir uma cuidadosa selecção do material, a qualidade da matéria-prima e as suas características aromáticas devem ser preservadas, a amostra deve ser representativa do material vegetal e deve ser em quantidade suficiente para corresponder às necessidades do consumidor.

O método utilizado na extracção ou isolamento pode ser hidrodestilação, adsorção, destilação por arrastamento de vapor a pressão atmosférica ou baixas pressões, sublimação por vácuo e extracção por solvente.

O teor em extracto e a sua composição dependem de diversos factores como humidade e condições de armazenamento, pré tratamento das matérias-primas e condições de extracção, esta última muito importante porque o uso incorrecto da temperatura, tempo de extracção ou presença de oxigénio pode produzir compostos com diferenças daqueles que se encontrem originalmente na matéria-prima. É também possível que ocorram interacções entre os compostos responsáveis pelo aroma.

Estes constituintes são sintetizados pela planta durante o seu desenvolvimento normal e a composição química do óleo é geralmente característica da espécie, podendo apresentar multiplicidade de quimiotipos. A proporção dos compostos presentes num dado óleo essencial é muitas vezes expressa em termos de um ou mais componentes específicos (por exemplo, citral no óleo de limão, a razão mentol/mentona nos óleos de hortelã-pimenta). De há muito que vêm sendo estabelecidas relações entre a biossíntese dos compostos do aroma, as características químicas e os atributos sensoriais (Heath, 1981).

Compostos voláteis dos óleos essenciais de várias plantas também possuem bom potencial como agentes naturais de conservação dos alimentos. Foi verificado que o óleo essencial de orégão possui propriedades antioxidantes assinaláveis, devido à presença de carvacrol e timol, e talvez também devido a efeitos de sinergia entre compostos contendo oxigénio (Kulisic *et al.*, 2004).

3.2.1. Métodos de Extracção

O método de extracção utilizado é muito importante, pretende-se que o aroma extraído seja o mais próximo do existente na matéria-prima. Vários são os métodos utilizados na extracção como a hidrodestilação, extracção por solvente, extracção por fluidos supercríticos e sublimação em vácuo. No entanto neste trabalho será referido apenas o método de extracção por hidrodestilação.

A hidrodestilação é e tem sido o principal método de extracção de aromas. Durante a hidrodestilação os componentes do óleo essencial formam uma mistura azeotrópica com a água. A maior parte do óleo essencial é insolúvel em água, por isso depois da condensação, eles são separados por decantação. O período de destilação pode levar entre 15 a 30 minutos ou mais (Peyron e Richard, 1992). O período de extracção influencia não só a quantidade do extracto mas também a sua composição.

A hidrodestilação pode ser conseguida através de dois métodos:

- Destilação por Clevenger – o material a ser extraído é imerso em água e depois submetido a temperaturas de ebulição.
- Destilação por arrastamento de vapor – o material a ser extraído é atravessado por uma corrente de vapor.

Nos dois métodos o vapor dos compostos voláteis é conduzido pelo vapor até ao condensador. No condensador formam-se camadas de óleo e água que são separadas por decantação.

Durante as duas formas de condensação a amostra é exposta a temperaturas próximas dos 100°C, que podem levar a mudanças em compostos termicamente instáveis. Uma exposição prolongada pode levar à hidrólise de esteres, polimerizações dos aldeídos ou decomposição de outros componentes.

A hidrodestilação a temperaturas elevadas é utilizada em plantas cujos óleos essenciais são difíceis de extrair. No entanto, devido às elevadas temperaturas utilizadas o perigo de decomposição é ainda maior. A hidrodestilação a pressões reduzidas será melhor pois as temperaturas a serem utilizadas podem ser mais baixas.

4. Obtenção de Óleo Essencial de Orégão

Neste trabalho utilizou-se como matéria-prima as folhas e inflorescências de *Origanum virens* L. Estas foram previamente secas ao ar e armazenadas ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Segundo Deans *et al* (1990), citado em Vieira (1998) a redução de água disponível na planta não só previne o crescimento de microrganismos que podem causar danos, como evita perdas de aroma, bem como a degradação da cor original da planta.

A extracção do óleo foi efectuada por destilação por arrastamento de vapor (figura 1) durante cerca de 50 minutos. Na coluna de vidro, isolada termicamente com lã de vidro, foi inserido entre 150 a 200g de folhas e inflorescências de orégão. A extracção foi feita a uma temperatura de cerca de 100°C. Os condensados foram recolhidos no tubo de recolha e transferidos para um frasco de vidro. Os óleos essenciais foram recolhidos para um outro frasco.

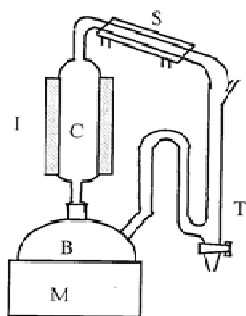


Figura 1 - Representação esquemática do aparelho de destilação por arrastamento de vapor. B – balão gerador de vapor; C – coluna de vidro; I – material isolante; M – manta de aquecimento; S – condensador; T - Tubo de recolha.

Os rendimentos totais de extracção foram calculados segundo a fórmula:

$$RT = [(massa \text{ de extracto}) / (massa \text{ de orégão a extractar})] \times 100$$

No caso da matéria-prima utilizada neste trabalho obtivemos um rendimento médio de 3%.

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE MATRIZES ENCAPSULANTES

1. Objectivo do Capítulo

Existem vários materiais que podem ser utilizados como agentes de encapsulamento de aromas. Neste capítulo apresentam-se alguns dos materiais já estudados.

Foi principal objectivo deste capítulo estudar a possibilidade de produção de matrizes encapsulantes a partir de sistemas de gelatina e sacarose, em diferentes concentrações, atendendo aos efeitos benéficos da associação dos dois tipos de substâncias e avaliar a capacidade de formação de cápsulas por atomização (“spray-drying”) e liofilização sob várias condições. As matrizes resultantes foram caracterizadas morfológicamente por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e tamanho médio de partícula. Utilizando o método das superfícies de resposta (RSM) avaliou-se a influência das condições de processamento naquelas características.

2. Matrizes Encapsulantes

A perda de aromas durante o processamento ou armazenamento de alimentos ocorre frequentemente na indústria alimentar. Dado que os aromas contribuem para as características desejáveis dos alimentos, necessitam de ser protegidos mediante tecnologias que permitam a sua retenção nos alimentos por um maior período de tempo (Pothakamury e Barbosa-Cánovas, 1995), como é o caso do encapsulamento.

A retenção do aroma numa matriz depende de vários factores relacionados com a natureza química da substância a incorporar (em termos de peso molecular, reactividade química e volatilidade), propriedades da matriz e da metodologia de encapsulamento (Madene et al, 2005).

Como misturas delicadas que são, os compostos voláteis constituintes dos aromas não devem ser submetidos a processamento drásticos, particularmente durante o processamento térmico dos alimentos (Tuley, 1996). Assim o encapsulamento assume uma extrema importância na estabilização de compostos aromáticos, permitindo um controlo mais eficaz na libertação dos mesmos.

É na selecção adequada de materiais de transporte (matrizes) que reside a maior limitação do encapsulamento. Estes devem ser: solúveis em água, apresentar boas propriedades emulsionantes, não apresentarem elevada viscosidade quando é elevado o conteúdo em sólidos da emulsão (superior a 60%), devem ser neutros em aroma, económicos e estáveis. As matrizes devem ainda, reter os componentes voláteis incorporados, protege-los contra a degradação e evaporação durante o armazenamento e permitir uma progressiva libertação dos mesmos quando inseridos no produto final (Reineccius, 1994).

A matriz seleccionada deve contudo depender da utilização pretendida. É possível utilizar uma grande variedade de polímeros naturais e/ou sintéticos que incluem: gomas vegetais (ex: goma arábica); amidos, celulose e derivados de amido e de celulose; dextrinas; ceras; açúcares; proteínas (ex. gelatina e proteínas de soja).

As matrizes devem proteger os ingredientes activos da oxidação, luz, humidade e, outras substâncias presentes no sistema alimentar, retardar a libertação das substâncias activas impedindo a vaporização dos compostos voláteis e por último devem permitir a introdução de ingredientes (Ribeiro, 2007). De acordo com Pegg e Shahidi (1999), a matriz ideal deve apresentar boas propriedades reológicas como por exemplo: baixa viscosidade a altas concentrações de modo a facilitar o encapsulamento, boa capacidade para dispersar e emulsionar as partículas estabilizando-as, não ser reactivo com as substâncias a encapsular, capacidade para reter e manter a substância na sua estrutura durante a aromatização, capacidade para reter e manter a substância na sua estrutura durante o processo e armazenamento, capacidade para libertar completamente o solvente ou outras substâncias utilizadas durante o processamento de encapsulamento contra condições ambientais: oxigénio, luz, calor, humidade, solúvel em solventes usados em indústria alimentar, água e etanol, qualidade alimentar e baixo custo.

Os materiais de revestimento são seleccionados de acordo com o composto que se pretende encapsular e podem ser glúcidos, proteínas, lípidos ou ceras. Segundo Brazel, 1999 citado por Ribeiro (2007), os mais utilizados em indústria alimentar são os polissacáridos, as proteínas e os lípidos. Na tabela estão representados alguns exemplos de matrizes encapsulantes.

Tabela 2 - Exemplos de materiais utilizados em matrizes.

Classe	Matriz
Proteínas	Gelatina, péptidos, caseína, glúten, albumina
Glúcidos	Amido nativo e modificado, maltodextrinas, sacarose
Gomas	Goma-arábica, agar, alginato de sódio, carragenina.
Celuloses	Carboximetilcelulose, metilcelulose
Lípidos	Cera, parafina, óleos, ácidos gordos

Segundo Gharsallaoui (2007) muitos biopolímeros têm sido utilizados no microencapsulamento tal como as gomas naturais (goma arábica, alginatos, carragenina, etc) proteínas (proteínas do soro, gelatina, etc) e maltodextrinas.

No entanto podem surgir combinações entre os diferentes materiais de modo a promover as características morfológicas que favoreçam o encapsulamento e/ou a libertação posterior. A capacidade de protecção é atribuída à boa combinação de formação de filme, às propriedades plásticas e ao poder redutor. A plasticidade da parede evita a fractura da matriz protectora, e o poder redutor retarda a oxidação dos aromas encapsulados.

Segundo Reineccius (1988) *citado em* Gharsallaoui (2007) a maior perda de voláteis durante o microencapsulamento por “spray-drying” toma lugar nos primeiros estágios da secagem, antes da formação da crosta à superfície das partículas. No entanto, o uso de compostos específicos pode modificar as propriedades das microcapsulas. Assim, a adição de lactose às proteínas de soro parece melhorar a formação da crosta através da melhoria das propriedades de secagem da parede. Este efeito positivo da lactose tem sido atribuído à formação contínua de uma fase vítrea da lactose em que as cadeias da proteína são dispersadas (Rosenberg e Sheu, (1996) *citado em* Gharsallaoui (2007)).

2.1. Materiais Encapsulantes

2.1.1. Glúcidos

Os glúcidos são muito utilizados em encapsulamento por atomização como componentes da matriz encapsulante. A capacidade dos glúcidos como amidos, maltodextrinas e goma acácia, de se ligarem aos aromas é complementada pela sua diversidade, baixo custo e o uso generalizado no encapsulamento. Adicionalmente, estes materiais têm propriedades tais como: baixa viscosidade, concentração de sólidos elevados e boa solubilidade, requisitos essenciais como agentes de encapsulamento (Madene, 2005).

2.1.1.1. Goma Arábica

A goma-arábica é um colóide vegetal obtido pela exsudação do tronco e ramos de árvores do género Acácia.

A goma-arábica é muito solúvel em água sendo possível preparar soluções aquosas com concentração até cerca de 50% em goma (Berlitz e Grosch, 1999). A viscosidade destas soluções só constitui um problema a elevadas concentrações. Esta característica é diferenciadora de muitos outros polissacáridos, que originam soluções com elevada viscosidade mesmo a baixas concentrações (Berlitz e Grosch, 1999).

A goma-arábica tem sido o agente de encapsulamento preferido há muitos anos. Entre as propriedades que levaram à sua aplicação na indústria alimentar contam-se a capacidade de formação de emulsões, formação de filmes nas interfaces, baixa higroscopicidade, baixa viscosidade, propriedades sensoriais (gosto e aroma) pouco marcadas, libertação dos aromas apenas aquando da hidratação e baixo custo. No entanto, a sua disponibilidade restrita e flutuação da qualidade tem levado à procura de materiais de substituição (Turbiano e Lacourse, 1988).

2.1.1.2. Amidos

Os amidos e seus derivados (amido modificado, maltodextrinas, β -ciclodextrinas) são muito utilizados na indústria alimentar na retenção e protecção de compostos voláteis. Eles podem

actuar como agentes de transporte no encapsulamento de aromas, substitutos de lípidos e também estabilizadores de emulsões (Madene, 2005).

Zhao e Whistler (1994ab) demonstraram que grânulos de amido de pequenas dimensões quando atomizados na presença de pequenas quantidades de proteínas ou polissacáridos hidrossolúveis têm a capacidade de se agregarem formando esferas porosas com potencialidade no encapsulamento.

2.1.1.3. Maltodextrinas

As maltodextrinas formam-se pela hidrólise parcial da farinha de milho com ácidos ou enzimas. O facto de possuírem baixa viscosidade a concentrações de sólidos elevadas e de estarem disponíveis em vários pesos moleculares, fazem destas bons agentes encapsulantes. No entanto, não são virtualmente bons emulsionantes e a sua capacidade de retenção de compostos voláteis é baixa (Madene, 2005).

2.1.1.4. Sacarose

A sacarose é um dissacárido utilizado para encapsular aromas e óleos. Individualmente não apresenta resultados interessantes. No entanto, quando combinada com a goma-arábica e com a gelatina apresenta bons resultados dependendo das condições de operação, nomeadamente da quantidade utilizada. Segundo Pegg e Shahidi, 1999 tem boa solubilidade em água, não é higroscópica e tem baixo custo. Apresenta elevado tempo de vida à temperatura ambiente e forma cristais em condições de desidratação (Kaushik e Ross, 2006).

A mistura de sacarose e maltodextrina é frequentemente utilizada como agente encapsulante em processos de encapsulamento por extrusão (Pegg e shahidi, 1999).

A sacarose é utilizada no encapsulamento de aromas alimentares por co-cristalização, contudo a sua estrutura química cristalina tem de ser modificada para uma microestrutura irregular formando aglomerados antes da ocorrência da co-cristalização (Pegg e Shahidi, 1999). Esta estrutura modificada é caracterizada por ter um espaço vazio considerável e elevada superfície específica que contribuem para a incorporação de compostos activos.

2.1.2. Proteínas

As proteínas, como o caseínato de sódio, proteínas do soro e isolados de proteínas de soja, são hidrocoloídes muito utilizados como encapsulantes de aromas, no entanto não têm sido muito utilizadas para este propósito (Kim *et al.*, 1996). Devido aos diferentes grupos químicos, propriedades anfífilas, habilidade para se associarem e interagir com vários tipos de substâncias diferentes, elevado peso molecular e cadeia molecular flexível, estas proteínas têm boas propriedades, tais como, solubilidade, viscosidade, emulsionantes para serem utilizados no encapsulamento. Durante a emulsão as proteínas rapidamente são adsorvidas na interfase óleo-água. O resultado é uma camada que protege as partículas de óleo da recoalescência e portanto estabiliza a emulsão durante o processamento e armazenamento (Dalglish, 1997; Dickinson, 2001).

2.1.3. Gelatina

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colagénio com a capacidade de formar um gel quando misturada com água. Trata-se de um polímero anfotérico, com propriedades aniónicas ou catiónicas em condições ácidas ou básicas respectivamente, que lhe confere um equilíbrio dinâmico associado à neutralização das soluções de gelatina (Xing *et al.* 2004). É utilizada em diversas áreas devido às suas propriedades mecânicas e origem biológica natural. (Iwamoto *et al.* 2002).

É uma proteína muito utilizada para o encapsulamento devido às suas propriedades de gelificação e tem sido objecto de estudo para o encapsulamento de aromas (Yoshi *et al.* 2001 citado em Kaushik 2006).

3. Encapsulamento

O encapsulamento é definido como a tecnologia de armazenamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em “cápsulas seladas” que podem libertar o seu conteúdo sob determinadas condições pré-estabelecidas (Sparks, 1981).

O encapsulamento confere um meio de protecção a componentes sensíveis dos alimentos, pode evitar perdas nutricionais, aplica-se a ingredientes sensíveis de sofrer alterações,

preserva aromas e cheiros, transforma ingredientes líquidos em sólidos fáceis de manusear e constitui uma forma de obviar a sazonalidade.

Uma tecnologia de encapsulamento é tanto mais eficiente quanto menores as perdas de aroma durante o processo, e quanto maior a concentração e estabilidade do aroma no produto final. São várias as técnicas e matrizes utilizadas.

Um número elevado de factores deve ser considerado para seleccionar o método mais correcto no encapsulamento de aromas Tuley (1996). É necessário ter em consideração:

- O tipo de material de transporte (matriz) a utilizar;
- O tipo de substâncias auxiliares que serão incorporados (solventes, ligantes, proteínas, ...);
- A solubilidade do aroma (hidrossolúvel ou lipossolúvel);
- Os parâmetros de processamento de aplicação específica a que o aroma encapsulado deve resistir (temperatura, pH, esmagamento, dissolução, ...) e o mecanismo de libertação do aroma;
- Especificações, como o tamanho de partículas, densidades e condições de armazenamento bem como a legislação em vigor.

Existem produtos/indústrias que podem beneficiar com o encapsulamento de aromas nomeadamente na confecção de gelados, iogurtes, sobremesas assim como alimentos congelados, pequenas refeições processadas em fornos microondas e refeições prontas. A indústria aplica esta técnica por inúmeras razões. Entre elas para estabilizar o conteúdo de determinados materiais, controlar a libertação desse conteúdo e para separar componentes reactivos e/ou incompatíveis com determinadas formulações.

Graças ao microencapsulamento de ingredientes, muitos produtos que eram considerados tecnicamente impraticáveis são agora possíveis. Tais ingredientes são totalmente envolvidos num material encapsulante, conferindo deste modo propriedades úteis e eliminando outras propriedades indesejáveis aos ou de ingredientes originais.

A aplicação do microencapsulamento na indústria alimentar pode: reduzir a reactividade do encapsulado com factores ambientais, diminuir a taxa de transferência do material encapsulado para o ambiente exterior, promover o fácil manuseamento, controlar a libertação do material do encapsulado, mascarar o sabor do encapsulado e; diluir o material do encapsulado em pequenas quantidades quando for para ser utilizado.

Na sua forma mais simples, a microcápsula é uma pequena esfera com uma parede uniforme à sua volta. O encapsulado pode ser material cristalino, uma partícula absorvente,

uma emulsão, uma suspensão de sólidos ou uma suspensão de microcápsulas de dimensões mais reduzidas. A maior parte das microcápsulas são pequenas esférulas com diâmetros compreendidos entre poucos micrómetros e poucos milímetros. De facto ambos, tamanho como forma, dependem do material e métodos usados para prepará-los. Os diferentes tipos de microcápsulas e microesferas são produzidos através de uma gama muito variada de materiais (monómeros e/ou polímeros) e por um grande número de diferentes métodos de encapsulamento: spray-drying, spray-chilling, spray-cooling, extrusão, liofilização, complexação por inclusão – ciclodextrinas, liposomas.

Uma vez efectuado o encapsulamento, a estabilidade do encapsulado depende da natureza dos componentes de aroma, da matriz utilizada, do teor de material activo de superfície, do teor de humidade e absorção de humidade do encapsulado, permeabilidade e integridade do encapsulado resultante.

Dziezak (1988), numa revisão sobre microencapsulamento de ingredientes alimentares, considerou que as técnicas usadas comercialmente ou em avaliação pela indústria alimentar para este fim, eram as seguintes: a atomização, revestimento em leito fluidizado, extrusão, coacervação e complexação por inclusão. Qi e Xu (1999) para além destas também referem a liofilização.

4. Métodos de encapsulamento

4.1. Atomização

4.1.1. “Spray-drying”

Este método tem sido utilizado durante décadas no encapsulamento de ingredientes alimentares como, aromas, lípidos e compostos corados. Durante o processo de secagem, a evaporação do solvente, que é na sua maior parte água, é muito rápido e o aprisionamento do composto em questão é quase instantâneo.

A atomização, sendo um processo de secagem, é utilizada como técnica de encapsulamento pelo aprisionamento do material activo numa matriz. O processo é geralmente dividido em três etapas: preparação de uma dispersão, homogeneização e a atomização em câmara de secagem.

O spray-drying é uma operação unitária através da qual uma solução ou emulsão é pulverizada numa corrente de gás quente para instantaneamente obter um pó. O gás habitualmente utilizado é ar ou mais raramente um gás inerte como o azoto. O líquido de alimentação pode ser uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. Dependendo do material utilizado na alimentação e das condições da operação, a produção do pó pode atingir dimensões desde muito finas (10-50 μm) a partículas de grande dimensão (2-3 mm).

Através do decréscimo da quantidade de água e da actividade de água, o spray-drying é generalizadamente utilizado na indústria alimentar de forma a assegurar a estabilidade microbiológica dos produtos, diminuir o risco de degradações químicas e/ou biológicas, reduzir os custos de transporte e armazenamento, e finalmente obter um produto com propriedades específicas como por exemplo solubilidade instantânea.

O objectivo da atomização é o de criar a maior superfície de transferência de calor entre o ar quente e o líquido de forma a otimizar a transferência de calor e massa. Quanto maior a energia fornecida, menor a dimensão das partículas. Para a mesma quantidade de energia, o tamanho aumenta com o aumento do caudal de alimentação. No entanto, o tamanho das partículas aumenta quando tanto a viscosidade como a tensão superficial do líquido são elevadas.

O contacto das partículas com o ar quente acontece com a atomização. A atomização pode efectuar-se em co-corrente ou em contra-corrente dependendo do atomizador. Em co-corrente a solução ou emulsão é alimentada na mesma direcção da corrente de ar quente. A temperatura de alimentação varia geralmente entre 150-220°C, a evaporação acontece instantaneamente e as partículas secas são expostas a temperaturas moderadas (50-80°C) o que limita degradações térmicas. Em contra-corrente, a alimentação efectua-se na direcção oposta á corrente de ar quente e assim as partículas secas são expostas a temperaturas elevadas o que limita este processo a produtos termo-sensíveis. A maior vantagem do processo em contra-corrente é o de ser considerado mais económico em termos de consumo de energia.

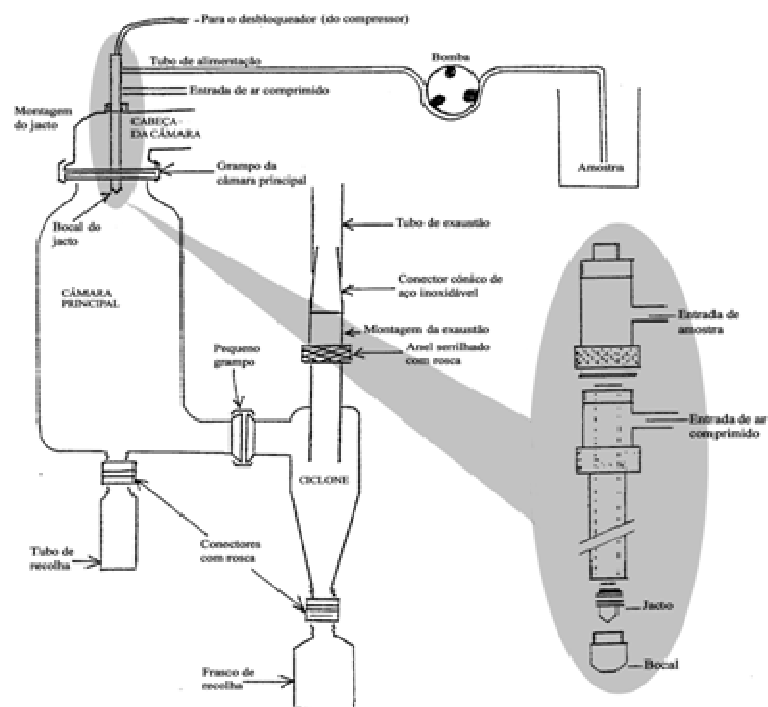


Figura 2 - Atomizador (“spray-dryer”) Lab-Plant modelo SD 05, Huddersfield, e pormenor do jacto atomizador.

Como um processo de microencapsulamento, o spray-drying é a mais comum dado ser a tecnologia menos dispendiosa para produzir materiais alimentares microencapsulantes. Comparado com outros métodos de secagem como por exemplo a liofilização, o custo do método por spray-drying é 30-50 vezes mais barato. No entanto é considerado como uma operação de desperdício de energia devido à impossibilidade de utilizar todo o calor da câmara de secagem.

Condições de secagem

Os principais factores que devem ser otimizados são temperatura de alimentação, temperatura de entrada de ar, e temperatura de saída de ar. De facto, a temperatura de alimentação modifica a viscosidade da emulsão e assim, a sua capacidade de secar homogeneamente. Quando a temperatura de alimentação é baixa, a viscosidade aumenta e o tamanho das cápsulas deve diminuir, mas altas temperaturas podem causar volatilizações ou degradações de alguns ingredientes sensíveis ao calor. O caudal de alimentação é ajustado para assegurar que cada partícula atinja o nível de secagem desejado antes de entrar em contacto com a câmara de secagem.

A maior perda de voláteis durante o microencapsulamento por spray-dryer ocorre nas primeiras etapas, antes da formação da crosta de secagem à superfície das partículas. No entanto, o uso de compostos específicos pode modificar as propriedades de secagem das microcápsulas.

Existem diferentes tipos de atomizadores, diferindo na dimensão, forma de atomização e geometria do atomizador. O atomizador é normalmente constituído por um orifício de descarga por onde o fluido escoia a alta pressão ou um disco animado de movimento rotativo originando uma força centrífuga; o orifício de descarga pode ainda ser de duplo fluxo embora não seja comum a sua utilização (Reineccius, 1988).

Segundo Reineccius (1988) os parâmetros de processo de atomização que mais influem na retenção dos constituintes do aroma são: teor de sólidos na alimentação ao atomizador, massa molecular e pressão de vapor dos compostos de aroma, tipo e massa molecular do encapsulante usado, concentração dos componentes de aroma, viscosidade do material de alimentação, velocidade do ar de secagem, temperaturas de entrada e de saída do ar de secagem, humidade do ar de secagem à entrada, dimensão da gotícula atomizada, temperatura do material de alimentação e dimensão das partículas da emulsão.

Coumans *et al.* (1994) elaboraram uma extensa revisão dos resultados disponíveis sobre as perdas de aromas durante a secagem por atomização e estabeleceram um conjunto de regras para as evitar: aumento das temperaturas do ar de entrada e da alimentação, aumento da concentração de sólidos dissolvidos na alimentação, adição de ligantes (como, por exemplo, a carboximetilcelulose) e de uma fase de óleo à alimentação, selecção adequada do tipo de atomizador e utilização de uma secagem com duplo estágio.

Parte do material a encapsular não fica encerrado nas cápsulas mas sim sobre a superfície exterior destas. Este é o chamado material activo de superfície colocando problemas de estabilidade, uma vez que não estando protegido, pode ser alvo de reacções de degradação.

4.1.2. “Spray-Cooling” e “Spray-Chilling”

Para além do processo convencional de atomização, existem outros dois processos de secagem por atomização a baixas temperaturas, diferindo basicamente daquele nas temperaturas do ar usado na câmara de secagem. No caso de formação de encapsulados difere também no tipo de encapsulante utilizado. A atomização convencional utiliza ar

quente para volatilizar o solvente da dispersão de material de revestimento. O “spray-cooling” e “spray-chilling” utilizam ar arrefecido à temperatura ambiente ou de refrigeração, consideravelmente abaixo do ponto de solidificação ou de fusão de uma gordura ou cera fundidas. No “spray cooling”, a substância encapsulante é normalmente um derivado de óleo vegetal, como por exemplo estearina, ou mono- e diglicéridos endurecidos com pontos de fusão de 45 °C a 122 °C (Dziezak, 1988). No “spray-chilling”, o material encapsulante deve apresentar pontos de fusão comparativamente mais baixos, de 32 °C a 42 °C, como por exemplo, óleos fraccionados ou hidrogenados. Encapsulantes com pontos de fusão ainda mais baixos também podem ser utilizados, contudo os produtos finais requerem manuseamento e condições de armazenamento especiais (Dziezak, 1988).

4.2. Liofilização

A liofilização é um processo que consiste na aplicação de duas operações unitárias, o congelamento e a secagem (liofilização propriamente dita) a uma pressão reduzida. É utilizado para preservar produtos, para os tornar mais práticos no que respeita ao seu transporte e manipulação, dada a redução de massa conseguida pela perda de água e pulverização de materiais.

É um procedimento de secagem cujo princípio é a sublimação do gelo de um produto congelado, portanto a água do produto passa directamente do estado sólido ao estado de vapor. O ciclo da secagem desenrola-se em duas fases:

- Fase da sublimação propriamente dita, chamada às vezes “desidratação primária”, que elimina cerca de 90% da água, de modo que o produto fique com uma humidade de cerca de 15%
- Fase da adsorção ou desidratação secundária, que elimina os 10% da água ligada restante e que permite ter um produto com uma humidade de cerca de 2%. Esta fase ocorre em vácuo, a temperatura de 20° a 60°C.

A sublimação terá de ter lugar a uma temperatura inferior a 0°C e uma pressão inferior a 610 Pascal (4,58 Torr) dado que o ponto triplo da água situa-se a uma pressão de 610 Pascal e uma temperatura de 0,01°C. Portanto um liofilizador terá de ter uma câmara de secagem e uma bomba de vácuo.

Também, a sublimação é uma permuta do estado endotérmico que consome cerca de 2800 KJ/kg de gelo sublimado. Devido a isto, o liofilizador precisa necessariamente de uma fonte de calor.

Por último, às pressões aplicadas na liofilização, o vapor de água ocupa volumes muito elevados: a -25°C , o volume específico do vapor é da ordem de $2000\text{m}^3/\text{kg}$. As bombas de vácuo não podem absorver volumes tão elevados pelo que é indispensável eliminar o vapor condensando-o sobre uma superfície fria chamada condensador.

A liofilização é uma operação essencialmente cíclica cujas fases são as seguintes:

- a) Pré tratamento do produto
- b) Aplicação de vácuo no liofilizador
- c) Sublimação (desidratação primária)
- d) Adsorção (desidratação secundária)
- e) Ruptura do vácuo

A liofilização tem custos energéticos elevados devido à necessidade de congelar o produto, de sublimar o gelo e adsorver o vapor de água, bem como ainda a necessidade de suportar o vácuo e a refrigeração. É ainda um processo lento resultante de elevadas resistência à transferência de calor e de massa. Estas razões têm limitado a sua utilização industrial. Para que seja mantida uma boa qualidade do produto final deve ser evitado que durante a sublimação a temperatura de sublimação exceda a temperatura a partir da qual se deforma a estrutura da matriz sólida do produto, que pode ocorrer devido a uma descongelação parcial do produto ou a uma transição de fase responsável por fenómenos de colapso da estrutura. Também deve-se ter em atenção a temperatura do produto seco ultrapasse a temperatura de secagem correspondente à existência de alterações do produto.

Segundo Kaushik e Ross (2006), o processo de liofilização forma uma matriz contínua em redor da molécula a encapsular. Este autor refere ainda que a matriz obtida através deste processo demonstra um carácter de protecção superior em relação a outros sistemas nos quais só existe uma camada de matriz que envolve a substância encapsulada. Contudo, a retenção por liofilização pode ser afectada por maiores vácuos promovendo a volatilização dos voláteis se estes não estiverem revestidos de modo apropriado no interior da matriz.

É um processo que pode ser aplicado a substâncias termo-sensíveis ou instáveis em soluções aquosas.

4.3. Leito Fluidizado

O encapsulamento em leito fluidizado processa-se suspendendo partículas sólidas do material activo numa corrente de ar quente ascendente. O agente encapsulante, fundido ou dissolvido num solvente vaporizável, é atomizado a partir do topo da câmara através de orifícios, depositando-se em fina camada na superfície das partículas do material a encapsular em suspensão. A turbulência da coluna de ar é tal que as partículas se elevam nas proximidades do centro da coluna, ao atingirem o topo afastam-se no sentido exterior e caem. Estes ciclos repetem-se várias vezes por minuto permitindo que as partículas sejam uniformemente revestidas. Os materiais encapsulantes são geralmente seleccionados de entre os derivados de celulose, dextrinas, emulsionantes, lípidos, derivados proteicos e derivados de amido (Ribeiro, 2007).

4.4. Extrusão

A extrusão é um processo que tem sido utilizado industrialmente para converter aromas sob a forma líquida, principalmente óleos essenciais, em sólidos. Envolve a passagem sob pressão de um material activo disperso numa massa de glúcidos fundida através de uma série de fieiras para o interior de um banho de líquido desidratante. Ao contactar com o líquido, o material de revestimento que forma a matriz de encapsulamento solidifica e aprisiona o material activo. Os filamentos extrudidos são separados do líquido, secos e calibrados.

Um exemplo deste processo consiste na extrusão de óleo de citrinos disperso em glóbulos microscópicos com um emulsionante adequado numa matriz fundida de sólidos de xarope de amido e glicerina (Crocker e Pritchett, 1978). A massa fundida é agitada a 125 °C num tanque com uma camisa de vapor, depois transferida para uma câmara selada e pressurizada com azoto. Os filamentos extrudidos através de uma série de fieiras caem num banho de isopropanol frio onde solidificam. São então reduzidos por agitação a bastonetes com cerca de 1 mm de comprimento, separados do banho e secos a vácuo.

Ao contrário da atomização, este tipo de encapsulamento não deixa nenhum aroma de superfície, aumentando assim a estabilidade do aroma. Contudo, o nível de aroma incorporado no produto encapsulado é em geral significativamente menor que nos aromas encapsulados por atomização. Mutka e Nelson (1988) afirmam ter conseguido, através da

modificação de procedimentos, preparar aromas encapsulados por extrusão com níveis de aroma duas vezes superiores aos dos produtos comerciais. Os produtos resultantes destes sistemas apresentam maior estabilidade e partículas de maiores dimensões. Contudo o seu elevado custo e baixa versatilidade têm limitado a aplicação na indústria.

Popplewell *et al.* (1995) referem o desenvolvimento de uma tecnologia de extrusão que apelidam de “solid-melt encapsulation” que afirmam ser um método versátil e de baixo custo permitindo a comercialização de corantes e aromas sob várias formas. Na sua essência, envolve os seguintes passos: mistura a seco dos ingredientes da matriz, aquecimento da matriz para induzir a sua fusão, mistura do aroma ou corante na matriz fundida, formação do produto nas dimensões ou forma pretendida e calibração.

Outro tipo de extrusão, a co-extrusão, utiliza um dispositivo que consiste em dois tubos de alimentação concêntricos através dos quais os materiais, de revestimento e activo, são bombeados separadamente para várias saídas. O material activo flui através do tubo central, o de revestimento através do externo. O dispositivo está na sua totalidade ligado a um veio vertical à volta do qual roda, sendo os materiais, activo e de revestimento, co-extrudidos através de orifícios concêntricos localizados nos orifícios de saída, sob a forma de bastonete de fluido constituído por material activo embainhado no material de revestimento. A força centrífuga atira o bastonete para fora, fazendo com que ele se quebre em partículas pequenas. Pela acção da tensão superficial, o material de revestimento envolve o activo na totalidade, completando assim o encapsulamento.

4.5. Coacervação

A coacervação é um fenómeno coloidal. Partindo-se de uma solução de um colóide num solvente apropriado, de acordo com a natureza do colóide, várias alterações podem originar uma redução da solubilidade do colóide. Como resultado desta redução, uma grande parte do colóide pode ser separada numa nova fase. Assim, o sistema inicial de apenas uma fase torna-se um sistema de duas fases: uma com baixa concentração de colóide e outra com elevada concentração de colóide. A fase rica em colóide fica num estado disperso e aparece como gotículas amorfas a que se dá o nome de coacervado. Em repouso, estas gotículas coalescem formando uma camada de líquido clarificada e homogénea rica em colóide, conhecida como camada de coacervado.

Assim que o coacervado se vai formando, para que o microencapsulamento ocorra, deve-se depositar ao redor das partículas ou gotículas de material activo e coalescer num revestimento contínuo, criando uma cápsula, embora ainda não estável. O passo final é o endurecimento da parede de coacervado e isolamento das microcápsulas, geralmente o passo mais difícil do processo.

A coacervação pode ser induzida por vários processos: alteração de temperatura, de pH ou adição de uma segunda substância como por exemplo solução concentrada de um sal ionizado (Magdassi e Vinetsky, 1996).

A coacervação pode ser classificada como simples ou complexa. A coacervação simples, como por exemplo, no caso da gelatina, envolve a utilização de um segundo polímero ainda mais solúvel em água ou outras substâncias fortemente hidrofílicas que produzem uma desidratação/dessolvatação das moléculas de gelatina acima do seu ponto de gelificação. A coacervação complexa pode ser induzida em sistemas contendo dispersos dois colóides hidrofílicos com cargas eléctricas opostas. A neutralização global das cargas positivas num dos colóides pelas cargas negativas do outro é utilizada para causar a separação da fase de coacervado complexo rica em polímero. O sistema gelatina-goma-arábica tem sido o sistema de coacervação complexa mais estudado. A coacervação complexa é possível somente a valores de pH abaixo do ponto isoeléctrico da gelatina. A estes valores de pH, a gelatina fica carregada positivamente enquanto a goma-arábica continua carregada negativamente, e a atracção entre estas macromoléculas forma um complexo insolúvel que se separa como uma solução viscosa. Esta fase líquida viscosa pode revestir, por exemplo, gotículas de óleos essenciais suspensas no meio aquoso. Após endurecimento das microcápsulas com glutaraldeído ou outro agente de endurecimento, estas são lavadas e secas.

A coacervação é por vezes classificada como separação em fase aquosa ou microencapsulação “óleo-em-água” e separação em fase orgânica ou microencapsulação “água-em-óleo”. No primeiro caso, o material activo é o óleo e deve ser imiscível na fase contínua, por exemplo, água. No segundo caso, um material activo polar é disperso numa fase contínua constituída por óleo ou num solvente não polar.

4.6. Complexação por inclusão – ciclodextrinas

O mecanismo de complexação por inclusão utiliza geralmente como matriz ciclodextrinas. As moléculas de ciclodextrinas aparentam a forma de um cone oco truncado. Átomos de hidrogénio e os átomos glicosídicos de oxigénio dos monómeros de glucose estão localizados na cavidade do anel da ciclodextrina. Estes grupos dão à cavidade carácter hidrofóbico e interagem com várias moléculas orgânicas ou com partes destas formando complexos. Os grupos hidroxilos dos monómeros de glucose estão localizados nas extremidades da molécula. Estes grupos interagem com a água conferindo às ciclodextrinas as suas propriedades de solubilidade em água e com os grupos polares de algumas moléculas para formar ligações de hidrogénio. O complexo ciclodextrina/molécula convidada forma-se por ligações covalentes podendo ser muito estáveis. A libertação do material activo ocorre quando há condições para o equilíbrio se deslocar no sentido da direita para a esquerda e frequentemente utilizado pela indústria alimentar com o fim de encapsulamento a nível molecular.

A dimensão da cavidade da ciclodextrina permite alguma selectividade na complexação das moléculas convidadas. Quanto maior a interacção entre as paredes da ciclodextrina e a molécula convidada, mais forte é a ligação. Se a molécula é pequena comparada com a cavidade, apenas parte da superfície da molécula convidada fica em contacto com as paredes da cavidade e o potencial total para a molécula interagir com a ciclodextrina não é atingido. A β -ciclodextrina é a ciclodextrina a mais utilizada.

Os complexos são tipicamente formados com compostos orgânicos. Uma larga gama de moléculas é capaz de formar complexos com as ciclodextrinas, tais como compostos alifáticos, derivados de fenil, anéis conjugados, e compostos heterocíclicos. Várias forças, tais como de van der Waals, interacções hidrofóbicas e interacções dipolo-dipolo podem estar envolvidas na ligação das moléculas convidadas com a cavidade da ciclodextrina. A forma da molécula é um importante factor que determina a formação do complexo. A forma é mais importante que o peso da molécula na complexação.

4.7. Liposomas

Os liposomas são vesículas de camada única ou múltipla constituídas por membranas de fosfolípidos envolvendo totalmente uma fase aquosa contida no seu interior (Margalit e

Yerushalmi, 1996). Estas vesículas formam-se espontaneamente quando os fosfolípidos são dispersos em meio aquoso. Uma porção do meio aquoso fica encerrada na membrana lipídica que então funciona como um meio de libertação controlada do material activo disperso na fase aquosa ou lipídica.

Os liposomas podem ser produzidos numa gama de dimensões que vai de alguns nanómetros a vários micrómetros. Foram originalmente desenvolvidos para responder às necessidades de libertação controlada de fármacos. Na indústria alimentar foram aplicadas pela primeira vez na libertação controlada de enzimas no fabrico de queijo (Reinceccius, 1995).

A estrutura dos liposomas depende geralmente do tipo de fosfolípidos. A lecitina não é solúvel em água, tendendo a formar camadas duplas planas de forma a minimizar a interacção com a água. Os grupos polares da lecitina orientam-se no sentido da fase aquosa, enquanto as cadeias lipofílicas da lecitina se associam a outras cadeias lipofílicas de fosfolípidos, de outros lípidos ou materiais activos lipofílicos. Quando estas camadas tomam a forma esférica, não há interacção das cadeias lipofílicas com a água e forma-se assim uma partícula muito estável. Dependendo da sua composição e meios de produção, os liposomas podem ser constituídos por uma única camada ou por várias, podendo neste caso chegar até às centenas de camadas concêntricas. A estrutura física (espessura e número de camadas) e a composição têm influência sobre a capacidade de reter materiais activos e respectiva libertação (Reinceccius, 1995). Podem ser produzidos na sua totalidade a partir de materiais naturais não tóxicos, biodegradáveis, tendo várias aplicações tais como solubilizantes de substâncias difíceis de dissolver, dispersantes, libertação sustida de substâncias microencapsuladas (Lasic, 1996).

5. Materiais e Métodos

5.1. Materiais

Os materiais utilizados na produção de matrizes encapsulantes foram:

- Gelatina 80-100 Blooms (Panreac)
- Sacarose (Panreac)

5.2. Métodos de Produção da Matriz Encapsulante

Os métodos utilizados para a produção da matriz encapsulante foram a atomização por “spray-drying” e a liofilização. Os delineamentos experimentais utilizados para a atomização e liofilização, estão representados na tabela 3 e 4 respectivamente.

5.2.1. Atomização

Na tabela 3 estão representadas as formulações testadas e as condições de preparação das soluções e secagem da matriz encapsulante.

Tabela 3 – Delineamento experimental para a obtenção de matrizes a produzir por atomização.

Formulação	Teor de Sólidos Solúveis (%)	Gelatina (%)	Sacarose (%)	Temperatura do ar à entrada (Cº)	Temperatura do ar à saída (Cº) *
1	5	20	80	120	50 - 55
2	5	20	80	190	75 - 85
3	5	100	0	120	50 - 55
4	5	100	0	190	75 - 85
5	10	20	80	120	50 - 55
6	10	20	80	190	75 - 85
7	10	100	0	120	50 - 55
8	10	100	0	190	75 - 85
9	5	60	40	155	55 - 65
10	10	60	40	155	55 - 65
11	7,5	20	80	155	55 - 65
12	7,5	100	0	155	55 - 65
13	7,5	60	40	120	50 - 55
14	7,5	60	40	190	75 - 85
15 (Ponto Central)	7,5	60	40	155	55 - 65
16 (Ponto Central)	7,5	60	40	155	55 - 65

* Variável não controável, dependente das condições de trabalho.

Produziram-se 100 ml de soluções, a mistura dos componentes foi submetida a agitação magnética constante (400 rpm) e a temperatura de cerca de 30°C durante 30 minutos.

Todas as suspensões resultantes foram atomizadas no “spray-dryer” (Lab Plant SD-05) à escala laboratorial segundo as condições apresentadas na tabela 3 sendo constantes o caudal de ar (máximo possível), caudal de alimentação das dispersões ao secador (350 mL/h) e pressão no atomizador (1,9 bar).

As amostras desidratadas foram recolhidas no interior de frascos próprios, à saída do ciclone e depois armazenadas em tubos eppendorf devidamente selados.

5.2.2. Liofilização

Na tabela 4 estão representadas as formulações testadas para a secagem por liofilização.

As soluções foram preparadas como já descrito anteriormente. Foram em seguida colocadas em placas de petri e submetidas à liofilização.

As amostras foram congeladas até atingir a temperatura de -45°C durante aproximadamente 3 horas. Seguidamente procedeu-se à secagem em câmara de vácuo durante aproximadamente 3 dias.

Tabela 4 - Delineamento experimental para a obtenção de matrizes por liofilização.

Formulação	Teor de Sólidos Totais (%)	Gelatina (%)	Sacarose (%)
1	5	20	80
2	5	100	0
3	10	20	80
4	10	100	0
5	5	60	40
6	10	60	40
7	7,5	20	80
8	7,5	100	0
9 (Ponto Central)	7,5	60	40
10 (Ponto Central)	7,5	60	40

5.3. Métodos de Análise

5.3.1.1. Microscopia Electrónica de Varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) permite a observação e caracterização da superfície das estruturas assim como a identificação das mesmas por comparação com a morfologia conhecida anteriormente. Os resultados são imagens obtidas através da variação da reflexão de um feixe de electrões quando este embate na superfície das amostras previamente cobertas com uma fina camada de ouro.

As amostras, obtidas da produção da matriz encapsulante e dos encapsulados por “spray-drying” e liofilização, foram fixadas em porta-amostras com fita adesiva dos dois lados e revestidas com ouro (mistura de 95% ouro + 5% paládio) num “sputter coater” Polaron E5350 e observadas num microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM-5410, com uma voltagem de aceleração de 10 kV.

5.3.1.2. Tamanho de Partícula

O tamanho das cápsulas, obtidas por atomização, foi determinado a partir das imagens obtidas por SEM. Para tal, diversos campos das imagens foram seleccionados aleatoriamente.

Os resultados obtidos das determinações do tamanho médio das partículas foram tratados pela análise da distribuição do tamanho médio e pelo método de superfícies de respostas (RSM) ajustando uma equação polinomial, de segundo grau, que ajusta o modelo (para um intervalo de confiança de 95%) para a variável dependente “Y”

Equação 1:

$$Y = b_0 + b_1T + b_{11}T^2 + b_2TSS + b_{22}TSS^2 + b_3G + b_{33}G^2 + b_{12}TTSS + b_{13}TG + b_{23}TSSG$$

Em que, b_n são os coeficientes de regressão; G (% Gelatina), TSS (teor de sólidos solúveis) e T (temperatura do ar à entrada do atomizador) são as variáveis independentes.

Usou-se um delineamento experimental composto central. Esta prática consiste em três conjuntos de pontos experimentais:

- Um delineamento factorial com 2^k pontos, em que k é o numero de x_i variáveis (factores) com níveis codificados +1 e -1 para cada;
- 2^k pontos axiais (ou pontos estrela), num CCRD de k factores, codificados como $+\alpha$ e $-\alpha$, dependendo da distância desses pontos aos pontos centrais;
- Pontos centrais, que são replicados de modo a que seja possível prever a falta de ajuste do modelo estatístico linear obtido, assim como os erros naturais dos ensaios.

A principal vantagem desta metodologia é a diminuição do número de ensaios experimentais necessários para avaliar os múltiplos parâmetros e as suas interacções (Barros, 2007).

Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA/MANOVA. O tratamento estatístico foi efectuado a partir do programa STATISTICA 8.0 da Statsoft.

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Caracterização da Matriz Encapsulante obtida por Atomização

Todas as amostras, resultantes da secagem da matriz por atomização, apresentavam uma cor branca opaca. As imagens obtidas por SEM bem como a distribuição do tamanho de partículas foram analisadas.

5.4.1.1. Caracterização Morfológica

Os histogramas da figura 3, 4 e 5 representam a variação do tamanho médio das cápsulas produzidas segundo as diferentes formulações e condições de operação do atomizador. A análise foi efectuada tendo em conta a concentração de gelatina e sacarose utilizadas.

Os histogramas das figuras 3, 4 e 5 mostram a distribuição do tamanho de partículas para concentrações de gelatina de 20%, 60% e 100% respectivamente.

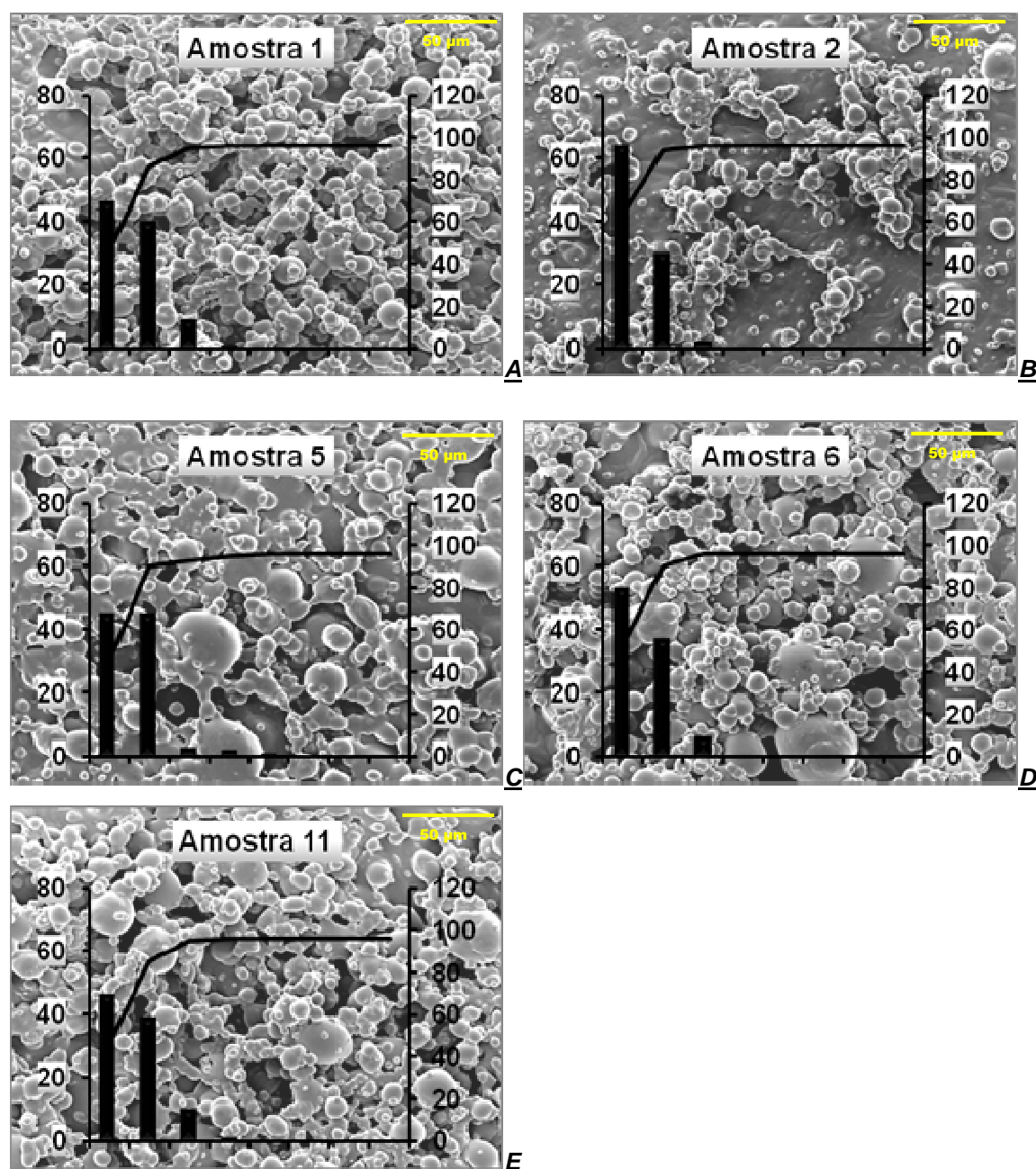


Figura 3 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulante com concentração de 20% gelatina e 80% sacarose. A: 5% TSS; 120°C. B: 5% TSS; 190°C. C: 10%TSS; 120°C. D: 10% TSS; 190°C. E: 7,5% TSS; 155°C.

A atomização da matriz de gelatina (20%) e sacarose (80%) (figura 3), promoveu a formação de cápsulas lisas e esféricas, com tendência para a formação de aglomerados como se pode observar nas imagens dos histogramas da figura 3. A aglomeração observada, ocorre apenas nas cápsulas de gelatina e sacarose para teores mais elevados de sacarose, o que pressupõe que esta seja a responsável para que tal aconteça. Segundo Pegg e Shahidi, 1999 a aglomeração observada é caracterizada por ter um espaço vazio

considerável e elevada superfície específica que contribuem para a incorporação de compostos activos.

Da análise dos histogramas da figura 3 verificou-se que o tamanho das cápsulas, com maior frequência, variava entre 0,9 a 10 μm e entre 10 a 15 μm e, menos frequentemente, entre 15 a 20 μm e 20 a 25 μm .

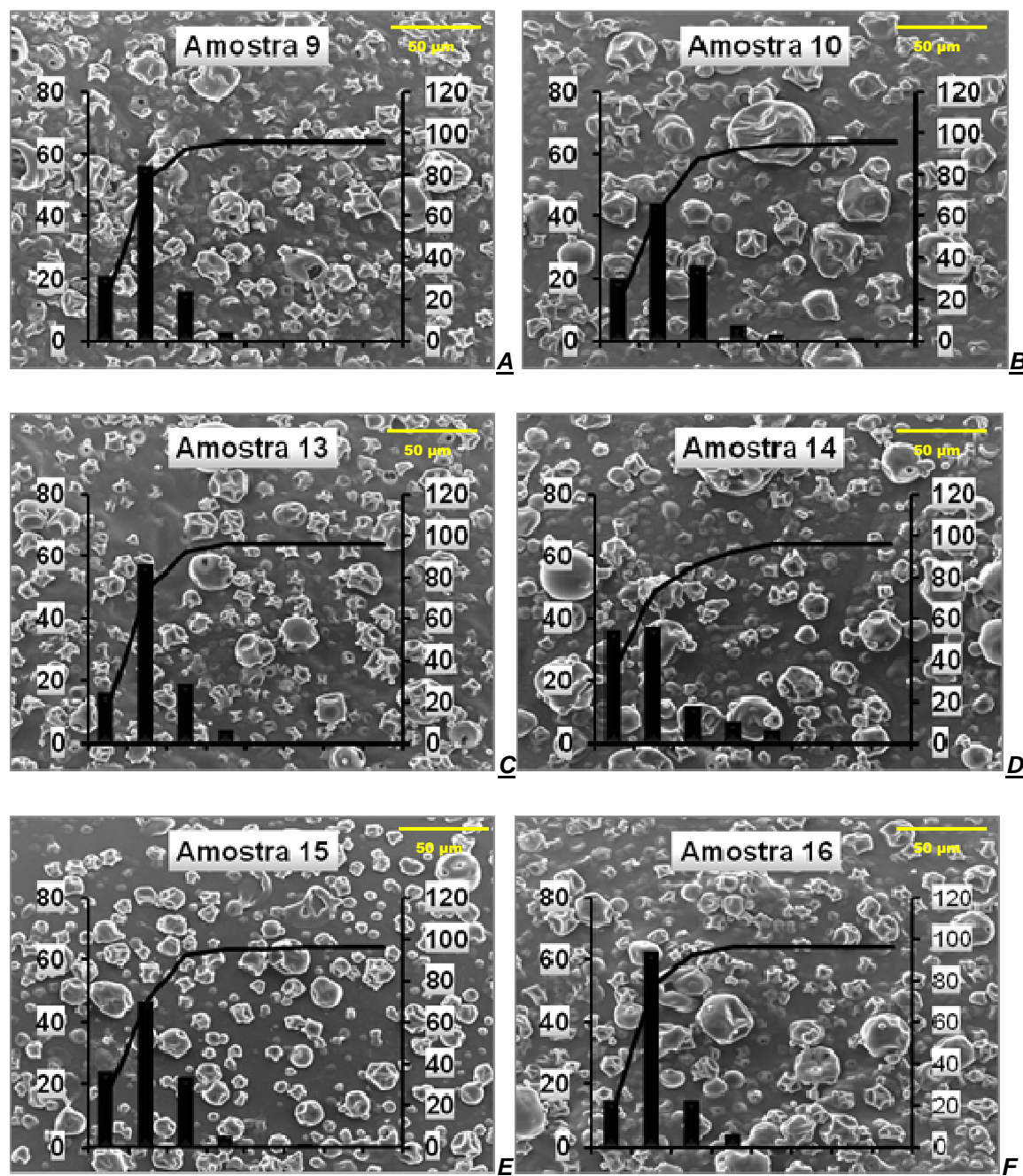


Figura 4 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulada com concentração de 60% gelatina e 40% sacarose. *A*: 5% TSS; 155°C. *B*: 10% TSS; 155°C. *C*: 7,5% TSS; 120°C. *D*: 7,5% TSS; 190°C. *E*: 7,5% TSS; 155°C. *F*: 7,5% TSS; 155°C.

Nas amostras com concentração de gelatina e sacarose de 60% e 40% respectivamente (figura 4), observam-se cápsulas lisas e esféricas. No entanto, também se podem observar cápsulas enrugadas e com rupturas.

Nota-se uma considerável variação do tamanho para as cápsulas com concentração de gelatina de 60%, que se pode verificar nos histogramas e imagens da figura 4. Os tamanhos variam entre 0,9 a 20 μm mas, com uma maior incidência para os tamanhos compreendidos entre 5 a 10 μm . A maior variação encontra-se nas cápsulas da amostra 14 (fig. 4 D).

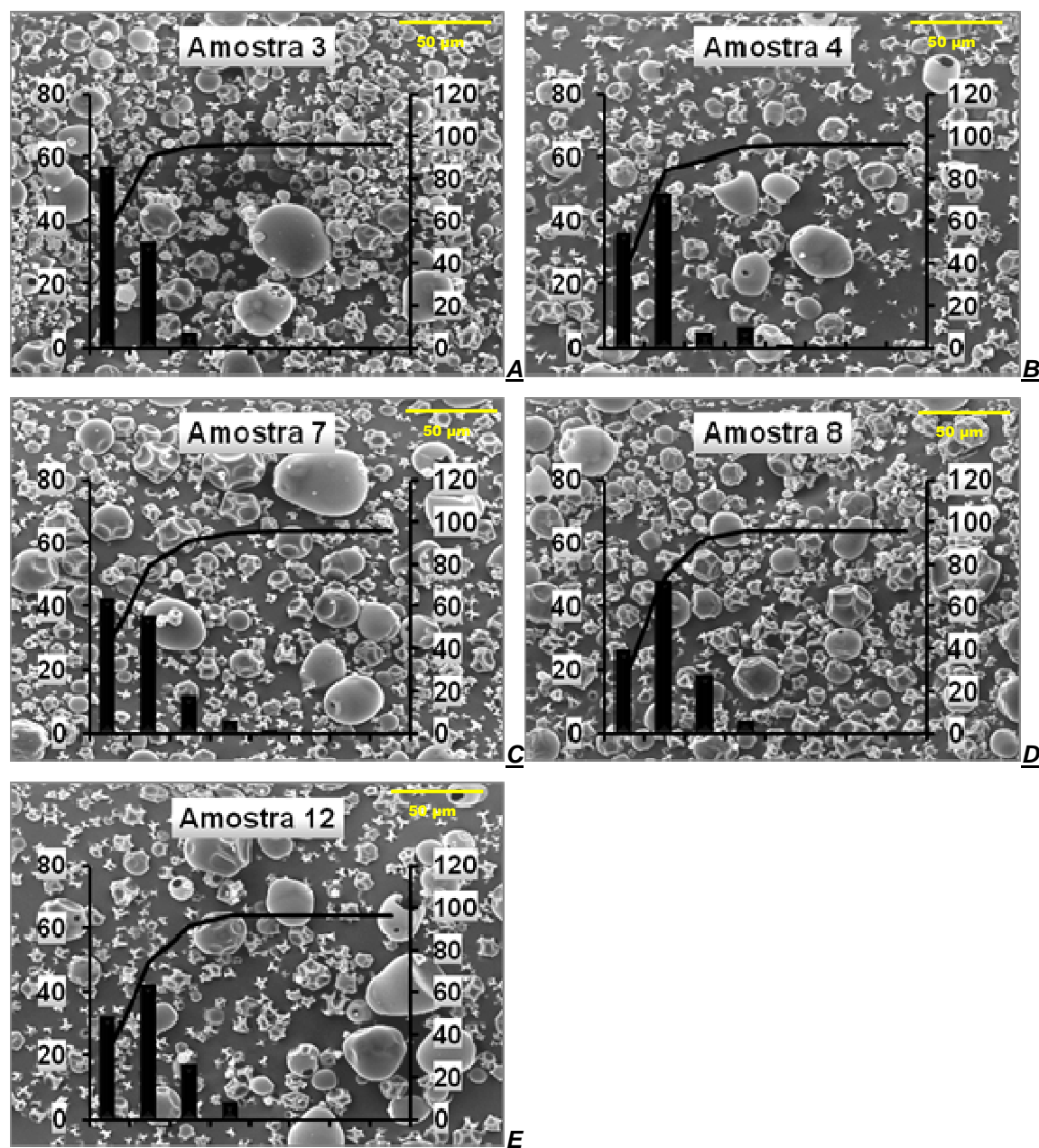


Figura 5 – Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas da matriz encapsulante com concentração de 100% gelatina. A: 5% TSS; 120°C. B: 5% TSS; 190°C. C: 10% TSS; 120°C. D: 10% TSS; 190°C. E: 7,5% TSS; 155°C.

As cápsulas obtidas por atomização das suspensões com 100% de gelatina são semelhantes na forma e tamanho às obtidas a partir de 60% de gelatina e 40% de sacarose como se pode observar na figura 5. Os tamanhos variam entre 0,9 a 20 µm mas, com uma maior incidência para os tamanhos compreendidos entre 5 a 10 µm.

A figura 6 mostra uma cápsula de gelatina rebentada onde se pode verificar que as cápsulas de gelatina são ocas. Pode ainda observar-se que a parede é constituída por uma fina película.

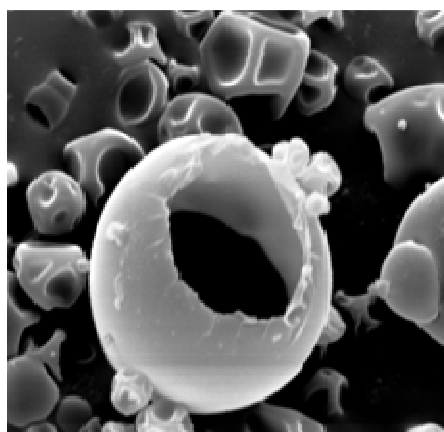


Figura 6 – Microcápsulas de gelatina, secção de uma cápsula rebentada.

Em resumo, desta análise, pode concluir-se que as cápsulas obtidas por atomização, apresentam maior variação do tamanho de partícula, quando a concentração de gelatina é superior à concentração de sacarose. No entanto de um modo geral, as cápsulas obtidas por secagem por atomização apresentam tamanhos variando entre 0,9 a 10 µm.

Atendendo a que cada classe de dimensões tem o seu peso, a análise estatística ao tamanho de partículas foi efectuada utilizando como tamanho médio o obtido pela média ponderada (D_{MP}) do tamanho das partículas. Assim, obteve-se a equação do modelo com o efeito das variáveis % de gelatina (G), teor de sólidos solúveis (TSS) e temperatura de ar à entrada do atomizador (T) no tamanho médio das partículas.

$$D_{MP} = -2,3871 + 0,08199T + 0,00034T^2 + 0,30161TSS - 0,01632TSS^2 + 0,06612G - 0,00107G^2 - 0,00003T * TSS + 0,0004T * G + 0,00201TSS * G$$

Os efeitos dos coeficientes com significância para o modelo ($p < 0,05$) são: TSS, G, G^2 e T*G com p-value de 0,008189, 0,001489, 0,000217 e 0,003964 respectivamente. O modelo tem um R^2 de 0,9693 e R ajustado de 0,9232.

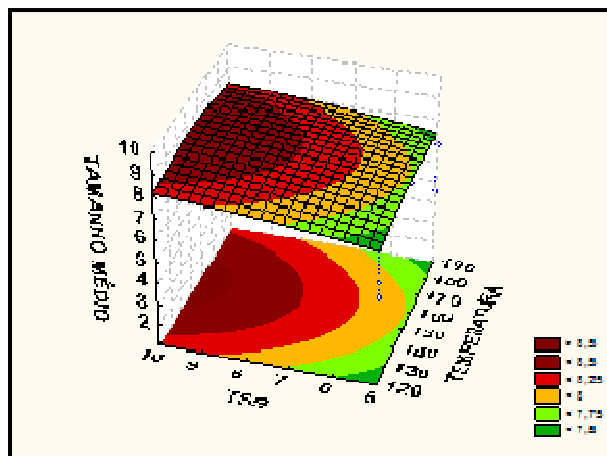


Figura 7 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes TSS e Temperatura.

Pela análise da superfície de resposta da figura 7 pode constatar-se que o tamanho médio aumenta quando aumenta o TSS e para valores medianos de temperatura (entre aproximadamente 140 e 170°C). No entanto não existe grande variação do tamanho médio das partículas.

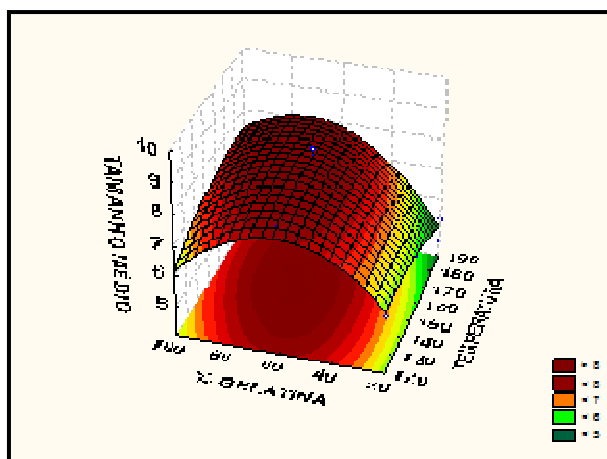


Figura 8 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes % Gelatina e Temperatura.

O tamanho médio das partículas é maior para valores de gelatina entre 45 - 85% de gelatina, a temperatura não parece ter muita influência, no entanto um aumento de temperatura leva a um ligeiro aumento do tamanho médio das partículas (figura 8).

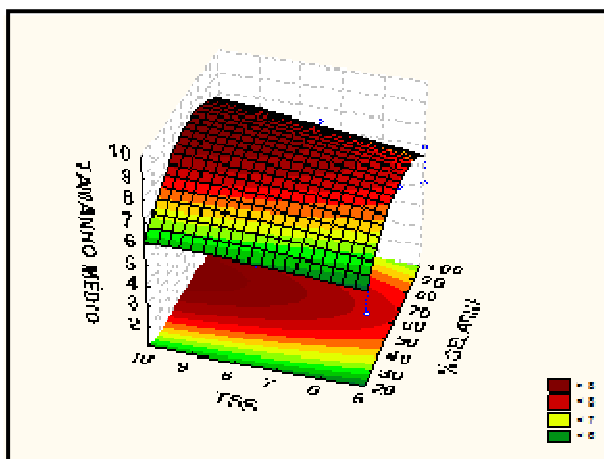


Figura 9 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes TSS e % Gelatina.

O valor médio do tamanho das partículas é maior para valores intermédios de gelatina, entre 45% - 85% (figura 9) e aumenta ligeiramente com o aumento do teor de TSS.

Os gráficos sugerem que a concentração de gelatina é a variável com maior influência no tamanho médio das partículas, o tamanho é maior para teores entre 45% - 85% de gelatina e por diferença, 15% - 55% de sacarose. A influência do teor de sólidos solúveis terá maior influência no tamanho das partículas quando há variação na temperatura, o tamanho aumenta quando há um aumento do teor de TSS.

5.4.2. Caracterização da matriz encapsulante obtida por liofilização

Todas as amostras, resultantes da secagem da matriz por liofilização, apresentavam uma cor branca opaca (figura 10).



Figura 10 - Amostra de liofilizado da matriz encapsulante.

5.4.2.1. Caracterização morfológica

As amostras correspondentes à formulação 1, 4 e 9 da tabela 3, foram observadas em SEM obtendo-se as imagens da figura 11.

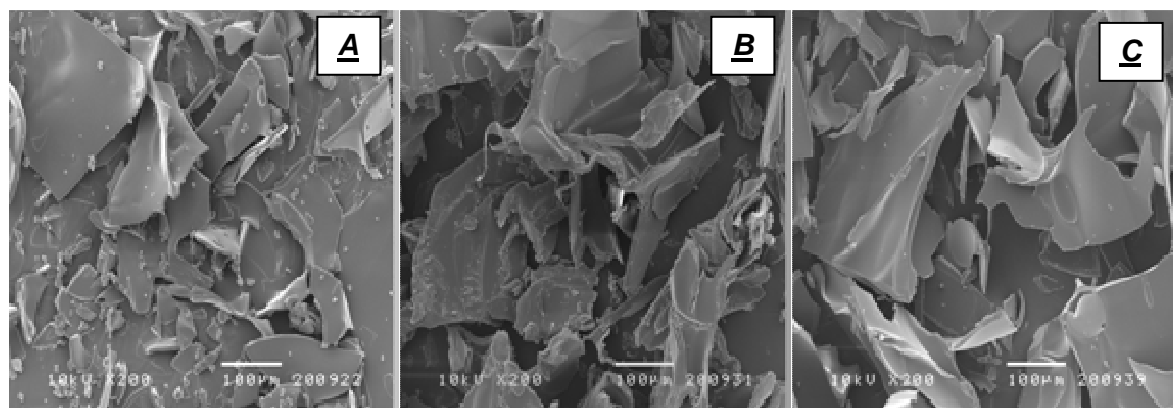


Figura 11 – Imagens obtidas por SEM das amostras da matriz encapsulante liofilizadas. A: 5% TSS; 20% Gelatina. B: 10% TSS; 100% Gelatina. C: 7,5% TSS; 60% Gelatina.

Da análise das imagens obtidas por SEM verificou-se que independentemente da composição da matriz encapsulante liofilizada, e contrariamente ao que ocorreu quando se utilizou a atomização, estas não apresentam estrutura ou forma definida. Poderá eventualmente ter formado vesículas que foram destruídas durante o fracionamento do material liofilizado.

CAPÍTULO IV – ENCAPSULAMENTO E LIBERTAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE OREGÃO

1. Objectivos do Capítulo

No sentido de estudar a aptidão para encapsular óleo essencial, das matrizes obtidas a partir do sistema de gelatina e sacarose, foi adicionado às suspensões de gelatina e sacarose o óleo essencial de orégão e tendo-se procedido ao encapsulamento por atomização em “spray-dryer” e por liofilização.

Foram utilizadas várias técnicas analíticas (Microscopia Electrónica de Varrimento, Microscopia Confocal, FTIR, Difusão) para a avaliação morfológica dos encapsulados e detecção não só da presença do óleo essencial nas matrizes (encapsulamento), mas também de possíveis interacções entre os componentes da matriz e o aroma bem como a cinética da sua libertação.

2. Libertação do Óleo Essencial encapsulado

As formas de produzir encapsulados já foram descritas. No entanto e dependendo da forma de encapsulamento os compostos encapsulados não se libertam sempre da mesma forma. Torna-se assim importante conhecer a forma como se libertam os encapsulados.

A libertação controlada pode ser definida como o método pelo qual um ou mais compostos activos ou ingredientes ficam disponíveis em determinado local e tempo a uma velocidade específica (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995).

A libertação de aromas pode ser induzida a ocorrer mediante determinadas condições, nomeadamente pela adição de líquidos (fenómeno de dissolução) ou sob a influência da temperatura e/ou pH.

Para encapsulamento de compostos voláteis em matrizes, a libertação depende de vários processos mutuamente dependentes como a difusão de compostos voláteis através da matriz, tipo e geometria das partículas, transferência da matriz para o meio ambiente e a degradação/ dissolução dos componentes da matriz (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995).

O tamanho das cápsulas e a sua distribuição influenciam a libertação controlada da substância activa, existindo mesmo um tamanho típico ideal recomendado (Iwamoto et al, 2002 citado em Miranda, 2007). Dependendo do método de encapsulamento, as matrizes podem apresentar várias formas (filmes, esferas, partículas irregulares), várias estruturas (porosidade ou compactos) e vários estados físicos (sólidos amorfos ou cristalinos). Estes aspectos vão influenciar a difusão dos aromas no produto alimentar durante o armazenamento (Madene, 2005).

As vantagens da libertação controlada baseiam-se na determinação de um momento específico para que a libertação ocorra e na taxa a que a substância activa é libertada. Deste modo minimizam-se perdas de material durante a manipulação ou processamento dos produtos e previnem-se reacções bioquímicas indesejáveis que podem levar ao consumo ou transformação da substância activa.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os materiais utilizados na produção de encapsulados foram:

- Gelatina 80-100 Blooms (Panreac)
- Sacarose (Panreac)
- Óleo essencial de *Origanum virens* L.

3.2. Métodos de produção dos encapsulados

Os métodos utilizados para a produção de encapsulados foram a atomização por “spray-drying” e a liofilização. As formulações utilizadas no delineamento experimental para a atomização e liofilização foram as mesmas utilizadas na produção da matriz encapsulante (Tabela 3 e 4 do capítulo 3) com adição de óleo essencial de *Origanum virens* L. na base dos 15% de teor de sólidos solúveis.

As suspensões foram preparadas nas mesmas condições excepto no que respeita à homogeneização depois da adição de óleo à suspensão. Para conseguir uma emulsão

estável procedeu-se à homogeneização em Ultra-Turrax (IKA EUROSTAR T25 Basic) a 8000 rpm.

As condições de atomização e liofilização dos encapsulados foram as mesmas utilizadas no capítulo anterior.

As amostras foram armazenadas em tubos eppendorf devidamente selados.

3.3. Métodos de análise

Os métodos utilizados para a análise dos encapsulados foram a microscopia electrónica de varrimento e a análise do tamanho de partículas (já referidas no capítulo 3), e também a microscopia confocal de fluorescência, espectroscopia de infravermelhos próximo com transformações de Fourier (FTIR), e difusão.

3.3.1. Microscopia Confocal de fluorescência

Esta técnica foi utilizada para detectar a presença e a forma em que o óleo se encontra nas matrizes de gelatina e sacarose obtidas por atomização e liofilização. O óleo essencial de orégão não é auto fluorescente, deste modo foi adicionado ao óleo essencial um pigmento, β -caroteno na proporção de 0,101g de óleo essencial para 0,1 mg de β -caroteno. Para a obtenção das imagens utilizou-se diferentes filtros (verde e azul).

3.3.2. Espectroscopia de infravermelhos médio com transformações de Fourier

Esta técnica permite que todas as frequências sejam registadas simultaneamente melhorando deste modo, a relação sinal/ruído o que permite o estudo de amostras pequenas ou de materiais com absorção pouco intensa. Além disso, o tempo necessário para fazer o varrimento é reduzido permitindo a análise de muitas réplicas que em associação com alguns modelos matemáticos permitem fazer uma previsão do tipo de ligações presentes na amostra.

Os espectros de FTIR das diferentes amostras foram adquiridos na gama de números de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} com uma resolução de 8 cm^{-1} , num espectrómetro Perkin Elmer – Spectrum BX, associado a um acessório Golden Gate (sistema de ATR (“Attenuated total reflection”, reflexão total atenuada)), com a acumulação de 32 scans. A análise dos espectros foi realizada recorrendo à “Análise em Componentes Principais” (PCA) com o software CATS.

3.3.3. Difusão do Óleo Essencial de Orégão

Em ensaios prévios testaram-se vários meios de dispersão das cápsulas produzidas com o objectivo de identificar o meio que permitia manter os encapsulados estáveis ao longo do tempo e assim determinar o coeficiente de difusão (D) do óleo essencial de orégão para as diferentes matrizes. Testou-se a estabilidade das cápsulas em diferentes soluções de etanol, acetona e tampão fosfato pH 4,2. Verificou-se que as microcápsulas de gelatina e sacarose ao fim de aproximadamente 8 horas começavam a desintegrar-se nos diferentes tipos de soluções analisadas, sendo notório que nas soluções com um maior teor de etanol (70 %) ou acetona (70 %) as microcápsulas perdiam a sua forma e formavam um precipitado não homogéneo. Por sua vez, um maior teor de solução tampão fosfato a pH 4.2 na solução permitiu uma solubilização da matriz dos microencapsulados e consequentemente a destruição destes. Quando comparado o efeito do etanol e da acetona nestas soluções é possível destacar que este último, provoca uma destruição da matriz muito mais acentuada e rápida do que o etanol. Assim com o objectivo de manter a estrutura o mais estável possível e durante o maior tempo, optou-se por utilizar a solução com 50 % solução tampão fosfato (pH 4.2) + 50 % etanol, para a avaliação da libertação controlada do óleo essencial de orégão através destes microencapsulados.

A estabilidade das partículas em diferentes soluções foi observada através da utilização de um microscópio óptico Leitz (Wetzlar, German) com a ajuda da objectiva de ampliação (4x) e objectiva de ampliação (10 x).

As partículas (100 mg) foram então introduzidas numa membrana de diálise (3000 Da) que foi colocada em 100 ml de 50 % solução fosfato tampão (pH = 4.2) + 50 % etanol, agitadas uniformemente, a 25 °C (figura 12). Amostras de 300 μL foram recolhidas ao longo do tempo e analisadas por espectroscopia UV (Elisa Biotech Synergy HT) a 277 nm. Os ensaios foram realizados em duplicado.

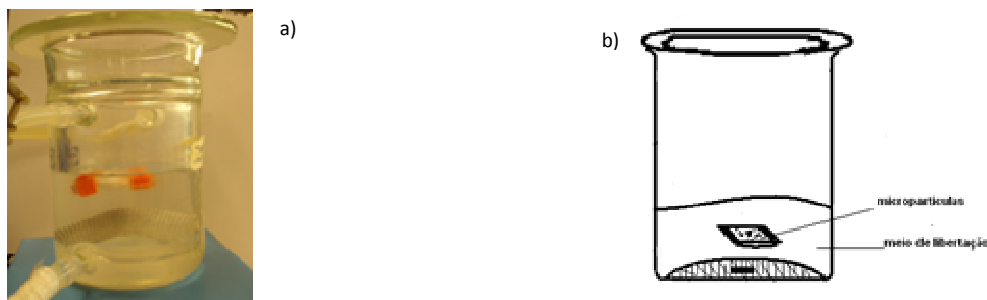


Figura 12 - a) Reactor com camisa utilizado para avaliar a difusão do óleo essencial de orégão; b) Esquema ilustrativo.

A liberação controlada de óleo essencial de orégão através de partículas esféricas, foi avaliada segundo a lei de Fick, assumindo que: (1) o óleo essencial se dispersa uniformemente através das diferentes matrizes das micropartículas; (2) não ocorre convecção; (3) a concentração de óleo de orégão no meio é próxima de zero (soluções muito diluídas); (4) a dimensão das micropartículas mantém-se constante, considerando que só ocorre variação deste parâmetro quando estas são introduzidas no meio (Prata *et al.*, 2008).

A determinação do coeficiente de difusão (D) foi obtida através das seguintes equações:

$$\frac{M_t}{M^\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{0.5} - \frac{3Dt}{r^2} \quad \text{para} \quad \frac{M_t}{M^\infty} \leq 0.7 \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{M_t}{M^\infty} = 1 - 0.61 \exp \left(- \frac{Dt \pi^2}{r^2} \right) \frac{M_t}{M^\infty} = 1 - 0.61 \exp \left(- \frac{Dt \pi^2}{r^2} \right)^{0.5} \quad \text{para} \quad \frac{M_t}{M^\infty} > 0.7 \quad \text{Equação 2}$$

onde M_t é a quantidade de óleo libertado no tempo t ; M^∞ a quantidade de óleo libertado a tempo infinito, quando o equilíbrio é obtido e r é o raio da partícula.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Caracterização dos Encapsulados Produzidos por Atomização

As amostras a saída do “spray-drying” apresentavam uma cor branca ligeiramente amarelada, resultado da adição do óleo.

3.4.1.1. Caracterização Morfológica

Tal como para as matrizes encapsulantes, a análise do tamanho médio das partículas foi efectuada tendo em conta a concentração de gelatina e sacarose utilizadas. Deste modo, os histogramas da figura 13, 14 e 15 representam a distribuição do tamanho de partículas para concentrações de gelatina de 20%, 60% e 100% respectivamente.

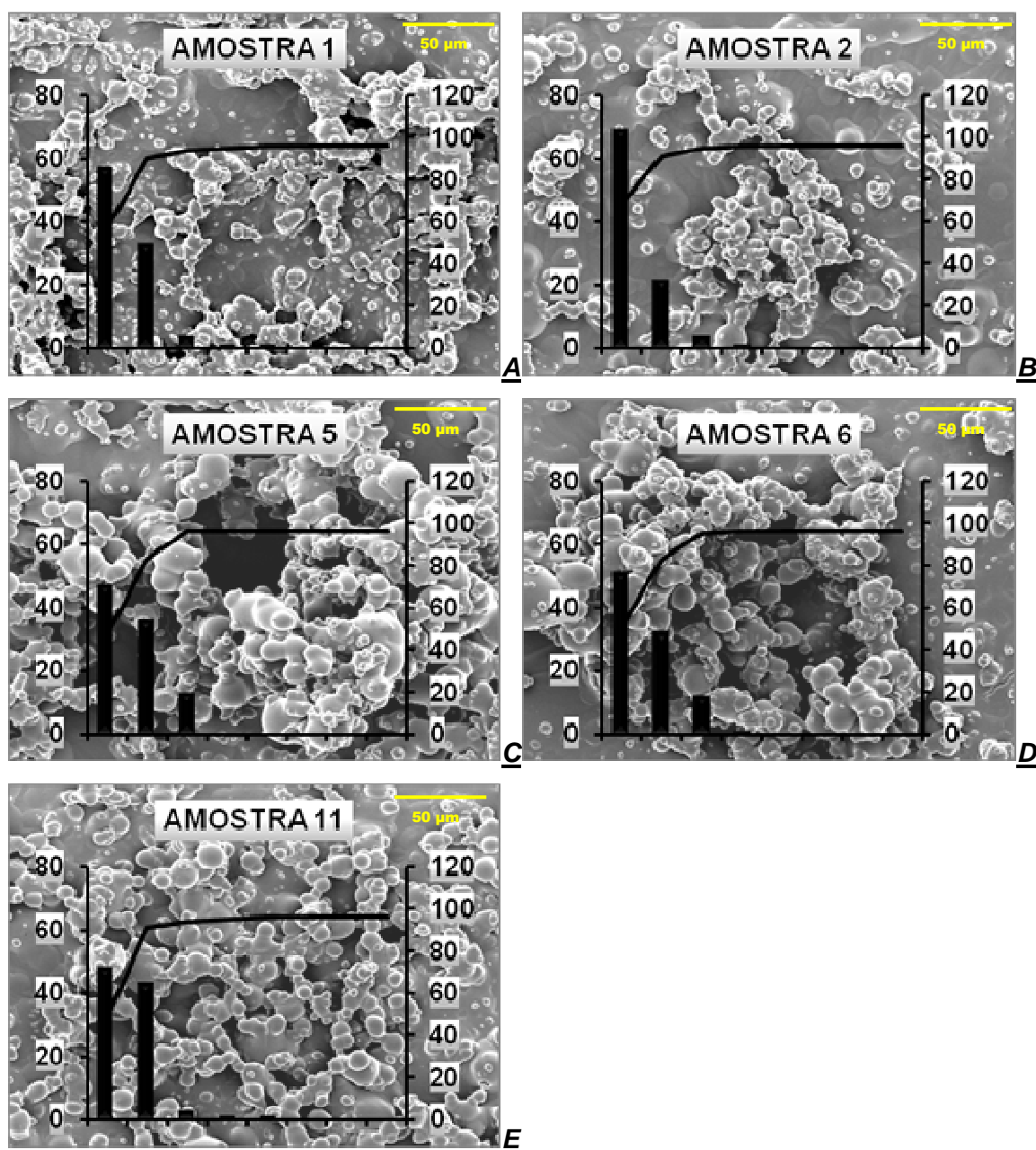


Figura 13 - Histogramas da distribuição dos diâmetros dos encapsulados com concentração de gelatina de 20% e sacarose 80%. A: 5% TSS; 120°C. B: 5% TSS; 190°C. C: 10% TSS; 120°C. D: 10% TSS; 190°C. E: 7,5 % TSS; 155°C.

As imagens da figura 13 (cápsulas de gelatina a 20% e sacarose a 80% com OE) apresentam forma semelhante às cápsulas produzidas sem OE (figura 3 – Capítulo III). Contudo, relativamente à distribuição do tamanho de partícula, os encapsulados apresentam maior frequência de dimensões entre 0,9 a 5 μm e menor frequência de dimensões entre 10 e 15 μm , comparativamente com as cápsulas produzidas sem OE (figura 3 – capítulo III).

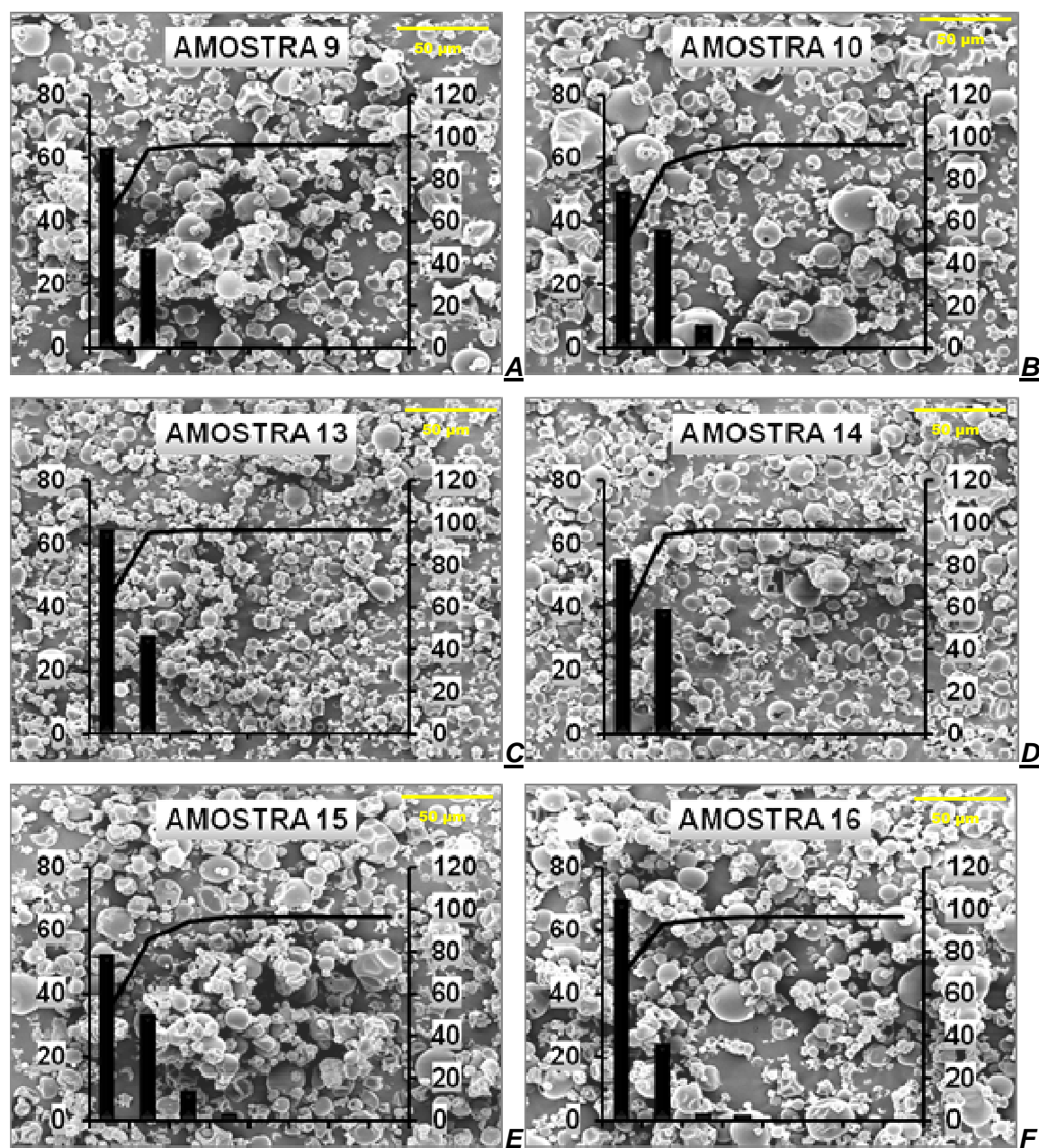


Figura 14 - Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas de gelatina (60%) e sacarose (40%) encapsuladas. A: 5% TSS; 155°C. B: 10% TSS; 155°C. C: 7,5% TSS; 120°C. D: 7,5% TSS; 190°C. E: 7,5% TSS; 155°C. F: 7,5% TSS; 155°C.

As imagens das cápsulas de gelatina a 60% e sacarose a 40% com OE (figura 14) apresentam forma semelhante às cápsulas produzidas sem OE (figura 4 – Capítulo III).

Relativamente à distribuição do tamanho médio das cápsulas, para amostras com teor de gelatina igual a 60% (figura 14), não se verifica a variação do tamanho observado para as cápsulas da matriz sem OE com a mesma concentração (figura 4 – Capítulo III). Os tamanhos variam entre 0,9 e 10 μm mas, com uma maior incidência para os tamanhos compreendidos entre 0,9 e 5 μm .

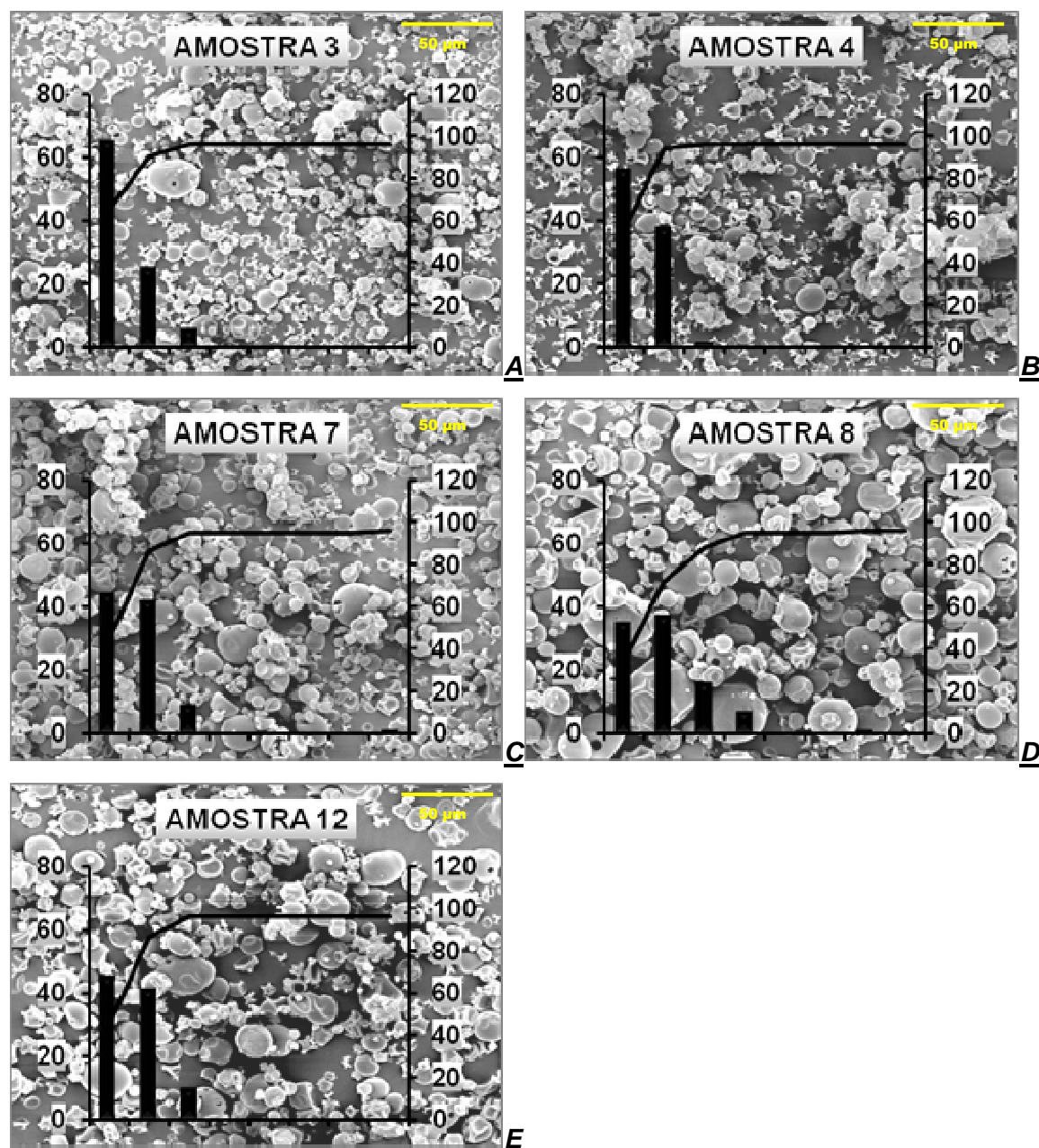


Figura 15 - Histogramas da distribuição dos diâmetros das cápsulas de gelatina (100%) encapsuladas. A: 5% TSS; 120°C. B: 5% TSS; 190°C. C: 10% TSS; 120°C. D: 10% TSS; 190°C. E: 7,5% TSS; 155°C.

As cápsulas de gelatina com teor de 100% com OE (figura 15) apresentam forma semelhante às cápsulas produzidas sem OE (figura 5 – Capítulo III). O tamanho destas cápsulas varia entre 0,9 e 15 µm mas com maior incidência para os tamanhos entre 0,9 a 5 µm.

Verificou-se uma diminuição do tamanho médio dos encapsulados relativamente às cápsulas da matriz encapsulante, esta diferença no tamanho médio das cápsulas pode ser devida a homogeneização mais vigorosa (ultra turrax a 8000 rpm) a que as soluções dos encapsulados foram sujeitas.

A análise estatística do tamanho de partículas foi efectuada para a dimensão média obtida pela média ponderada das dimensões das classes, tal como no capítulo III (D_{MP}). Obteve-se a equação do modelo com o efeito das variáveis % de gelatina (G), teor de sólidos solúveis (TSS) e temperatura de ar à entrada do atomizador (T) no tamanho médio das partículas.

$$D_{MP} = -5,5351 + 0,04748T + 0,00025T^2 + 0,69604TSS - 0,02779TSS^2 + 0,10326G - 0,00044G^2 - 0,002625T * TSS + 0,000228T * G + 0,002783TSS * G$$

Os coeficientes com significância para o modelo ($p < 0,05$) são: TSS e G, com p-value de 0,001116 e 0,028978 respectivamente. O modelo apresenta um ajuste com um R^2 de 0,9106 e R ajustado de 0,7765.

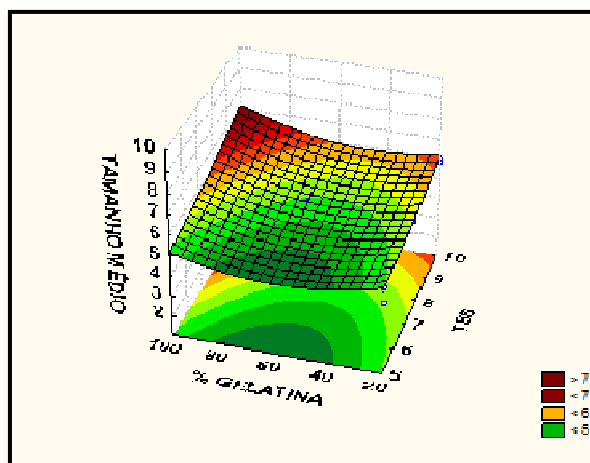


Figura 16 - Superfície de resposta do tamanho médio das partículas em função das variáveis independentes % Gelatina e TSS.

Pela análise da figura 16 verifica-se que o tamanho médio das partículas é menor para valores de concentração de gelatina intermédios (40% – 85%) e para valores mais baixos de TSS.

A temperatura que tinha influência no tamanho médio da partícula para as cápsulas da matriz encapsulante sem OE, deixa de o ter nos encapsulados. O teor de sólidos solúveis é a variável com maior influência no tamanho médio dos encapsulados. Estes resultados indiciam uma forte interação entre o óleo e as componentes da matriz.

3.4.1.2. Microscopia Confocal de Fluorescência

Da observação das imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência (figura 17, 18, 19 e 20), é evidente a presença de óleo, mas este não se encontra no interior das cápsulas. Parece que este se encontra uniformemente ligado à matriz o que pode ser explicado pela tendência do óleo para se ligar com proteínas como a gelatina. Não existem diferenças evidentes na disposição do óleo nas matrizes com diferentes condições de preparação e constituição.

Estes resultados vêm corroborar as observações anteriormente observadas no que diz respeito ao tamanho de partícula formada.

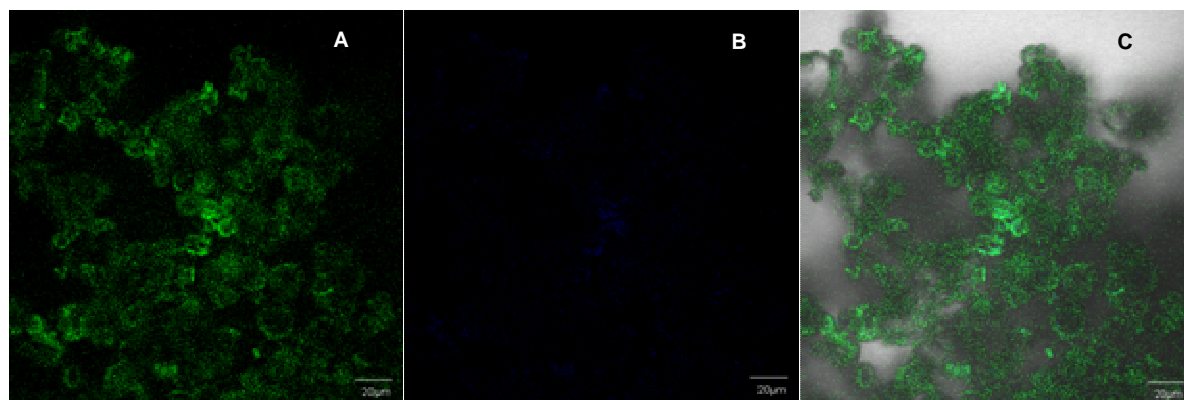


Figura 17 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 60% de gelatina, 40% de sacarose, 10% de TSS, 155°C. A – óleo de orégão e matriz atomizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – encapsulados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

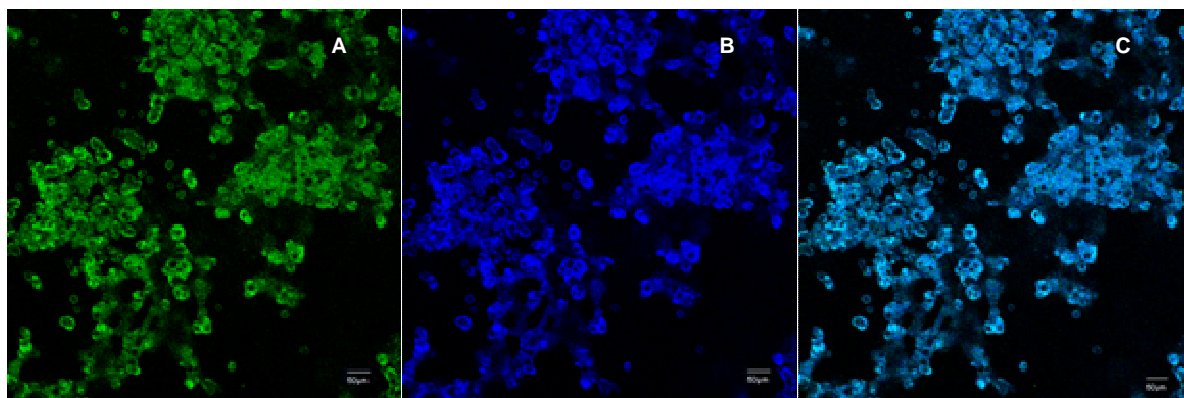


Figura 18 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 20% de gelatina, 80% de sacarose, 7,5% de TSS, 155°C. A – óleo de orégão e matriz atomizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – encapsulados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

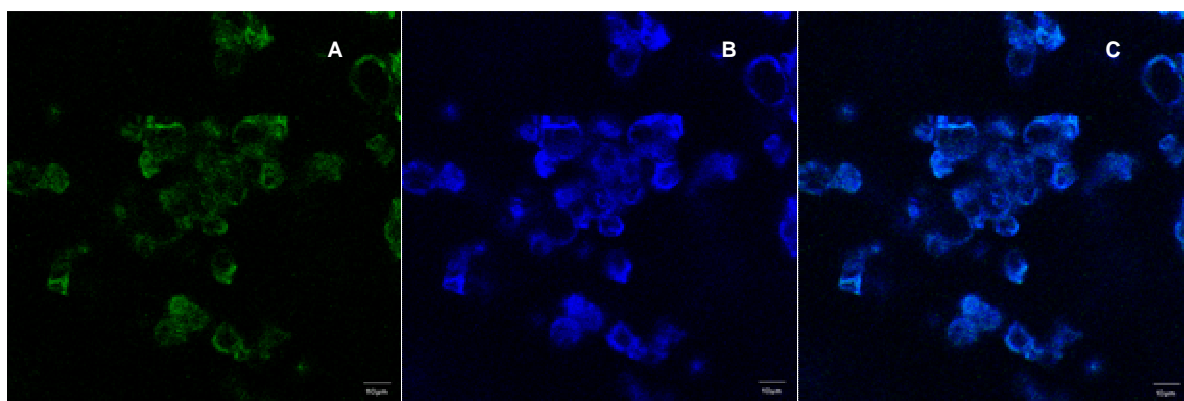


Figura 19 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 100% de gelatina, 7,5% de TSS, 155°C. A – óleo de orégão e matriz atomizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – encapsulados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

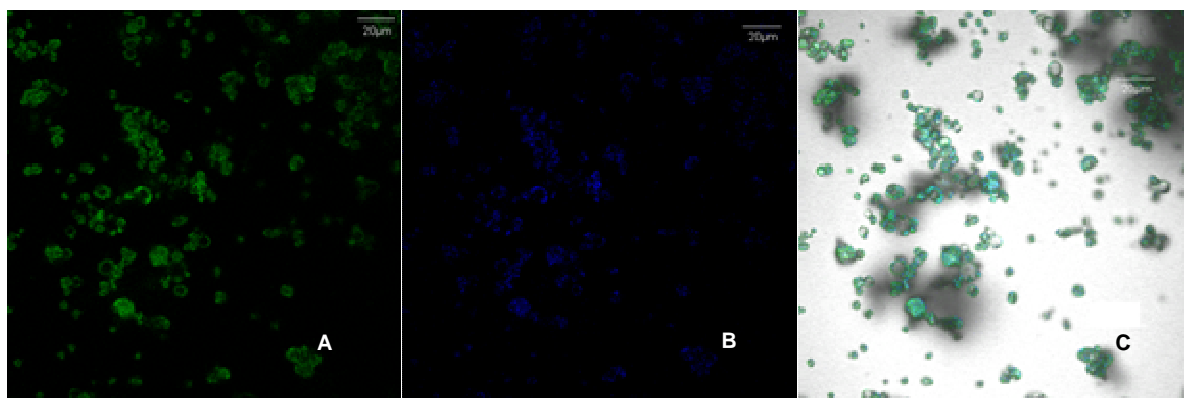


Figura 20 – Imagens captadas para as cápsulas atomizadas com 60% de gelatina, 40% de sacarose, 7,5% de TSS, 120°C. A – óleo de orégão e matriz atomizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – encapsulados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

3.4.1.3. Análise de FTIR

Através da análise por FTIR das cápsulas produzidas por atomização, observou-se que existem diferenças nos espectros obtidos, quando foi encapsulado o óleo essencial. Este resultado permite afirmar que o processo de encapsulamento foi eficiente.

A análise multivariada dos espectros obtidos por FTIR permitiu ainda verificar que amostras são agrupadas de forma diferenciada de acordo com a composição da matriz, teor de sólidos solúveis e temperatura de secagem.

Nas figuras seguintes encontram-se representadas as projecções das amostras no espaço definido pelas componentes principais (PC).

Na tabela 5 está a designação de cada tipo de resultado associado ao tipo de matriz e presença de OE para cápsulas obtidas da secagem por atomização.

Tabela 5 – Nomenclatura das variáveis em estudo para a análise multivariada.

Matriz 1	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 5% TSS e 120°C
Matriz 2	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 5% TSS e 190°C
Matriz 4	Cápsulas de gelatina (100%), 5% TSS e 190°C
Matriz 8	Cápsulas de gelatina (100%), 10% TSS e 190°C
Matriz 11	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 7,5% TSS e 155°C
Matriz 12	Cápsulas de gelatina (100%), 7,5% TSS e 155°C
Matriz 16	Cápsulas de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS e 155°C
Óleo 1	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 5% TSS e 120°C + 15% OE
Óleo 2	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 5% TSS e 190°C + 15% OE
Óleo 4	Cápsulas de gelatina (100%), 5% TSS e 190°C + 15% OE
Óleo 8	Cápsulas de gelatina (100%), 10% TSS e 190°C + 15% OE
Óleo 11	Cápsulas de gelatina (20%) e sacarose (80%), 7,5% TSS e 155°C + 15% OE
Óleo 12	Cápsulas de gelatina (100%), 7,5% TSS e 155°C + 15% OE
Óleo 16	Cápsulas de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,55% TSS e 155°C + 15% OE

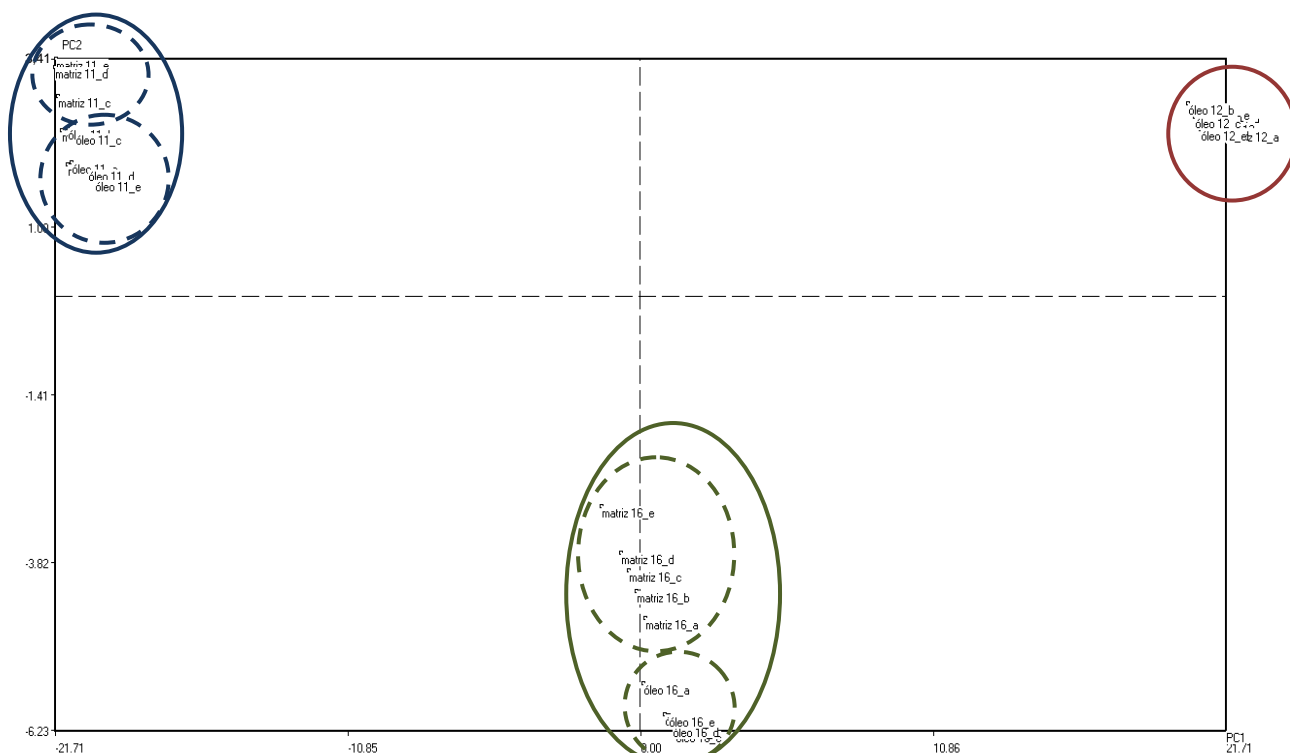


Figura 21 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (95%) e PC2 (4%) em função de diferentes concentrações de gelatina e sacarose e presença de OE.

A figura 21 evidencia as diferenças entre amostras com diferentes concentrações de gelatina/sacarose, com e sem OE. Verificaram-se 3 grupos distintos de dados. As duas primeiras componentes principais explicam 99% da informação.

Um grupo ocupa o primeiro quadrante, o segundo grupo ocupa o quarto quadrante e o terceiro grupo ocupa o segundo e terceiro quadrante. Observou-se que o grupo do quarto quadrante (matriz 11 e óleo 11) está associado aos resultados das cápsulas com 20% de gelatina e 80% de sacarose, o grupo do primeiro quadrante (matriz 12 e óleo 12) está associado aos resultados das cápsulas com 100% de gelatina e o grupo do segundo e terceiro quadrantes, está associado às cápsulas com 60% de gelatina e 40% de sacarose. Deste modo verificou-se que a primeira componente principal evidencia as diferenças entre o tipo de materiais constituintes das cápsulas.

Relacionando esta informação com os espectros de contribuição factorial para cada eixo, figura 22, e tendo em conta que o eixo com maior relevância é o eixo PC1 e que o grupo de resultados das cápsulas com 20% de gelatina está à esquerda do eixo PC1, são considerados os picos deste eixo da figura 22, na parte negativa da escala. As cápsulas com maior teor de sacarose encontram-se à esquerda do eixo PC1, logo na parte positiva do eixo PC1 da figura 22.

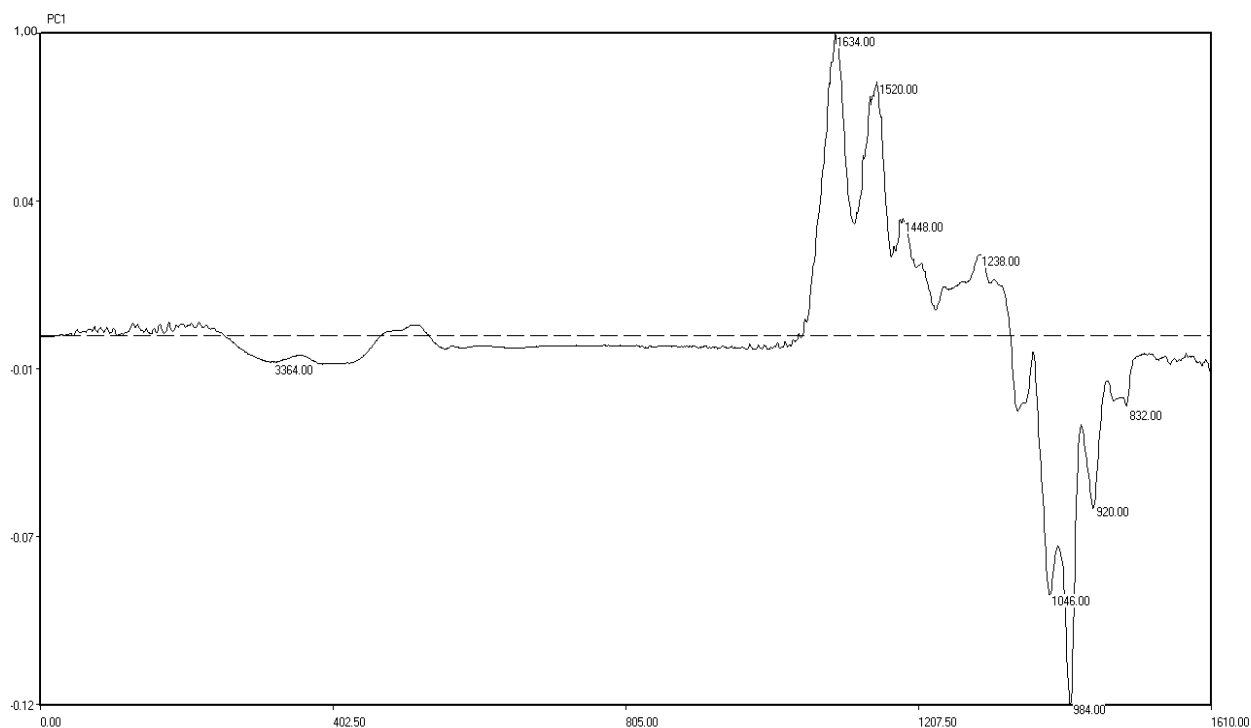


Figura 22 – Contribuição factorial da componente principal PC1 na análise das matrizes em função de diferentes concentrações de gelatina e sacarose.

No que respeita à separação das amostras em relação à presença de óleo essencial, esta não é tão evidente. As amostras com óleo apresentam-se em grupos próximos mas diferentes das matrizes correspondentes sem óleo. Assim é possível observar alguma separação do OE pela segunda componente principal, apesar de esta só explicar 4% dos resultados.

Nas amostras compostas apenas por gelatina a separação das amostras com óleo essencial não fica evidente na figura 21. No entanto quando esta é analisada isoladamente (figura 23) é confirmada a identificação da presença de óleo essencial de OE neste sistema.

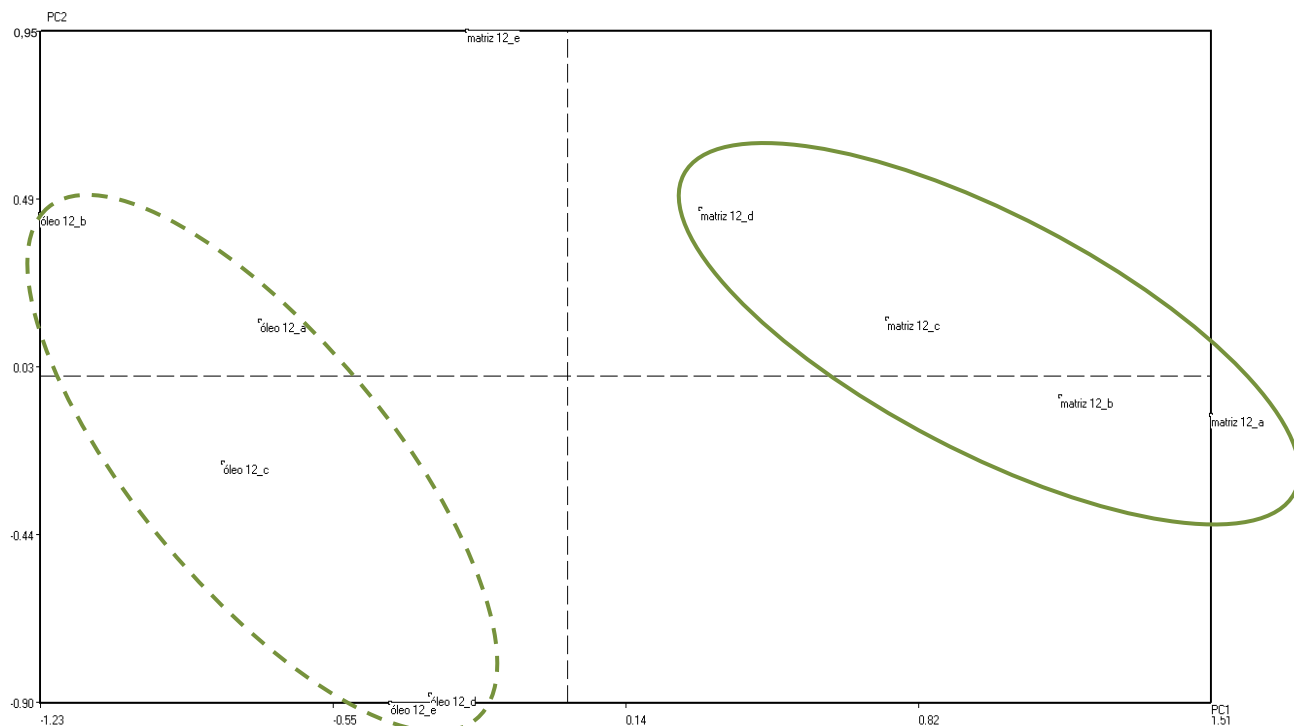


Figura 23 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (63%) e PC2 (26%) em função da presença de OE.

Em relação a cápsulas com composição semelhante mas com diferentes teores de sólidos solúveis (figura 24 e 25) existe também uma separação evidente dos resultados pelas três primeiras componentes principais (95,8%).

Quando o óleo essencial não está presente não há praticamente separação das amostras por teor de sólidos solúveis. Este resultado permite afirmar que, apesar de ter sido registada uma tendência de aumento de tamanho de partícula com o aumento do TSS, as cápsulas formadas apresentam características semelhantes. Esta observação é confirmada pela observação dos resultados numa outra dimensão relacionando PC1 e PC3 (2,8%) na qual também se distingue a mesma separação de dados (figura 25).

Relativamente à presença de óleo nas matrizes com o mesmo teor de sólidos solúveis, existe uma separação clara dos grupos pelo eixo PC2 (15%). As cápsulas com óleo encontram-se sempre na zona positiva do eixo, posicionando-se na parte negativa as cápsulas sem óleo. Observou-se ainda que a diferença nos grupos de resultados com diferentes teores de sólidos solúveis é maior para as matrizes adicionadas de óleo. Esta diferença pode ser resultante da forma como o óleo se encontra na cápsula pois, como

verificado nas imagens obtidas em microscopia confocal de fluorescência este, aparentemente está ligado à matriz e não sob uma forma livre no interior da cápsula.

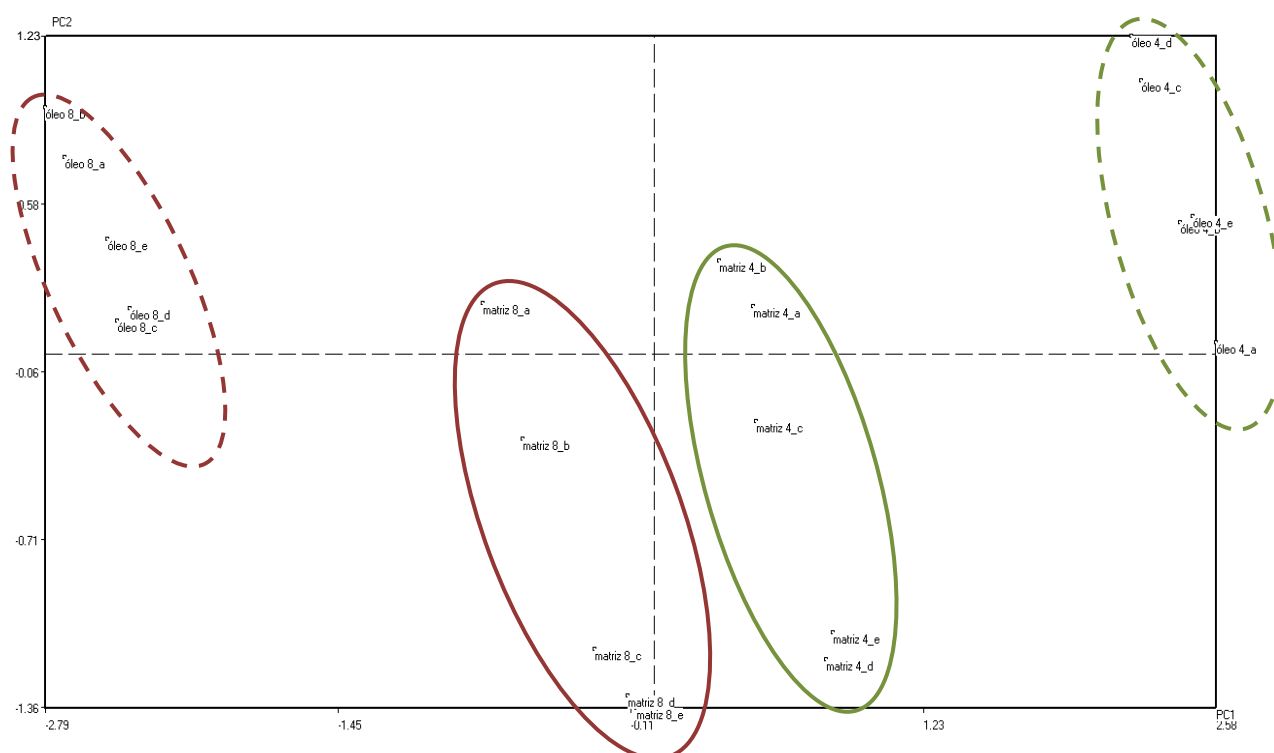


Figura 24 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (78%) e PC2 (15%) em função dos teores de sólidos solúveis e presença de óleo essencial.

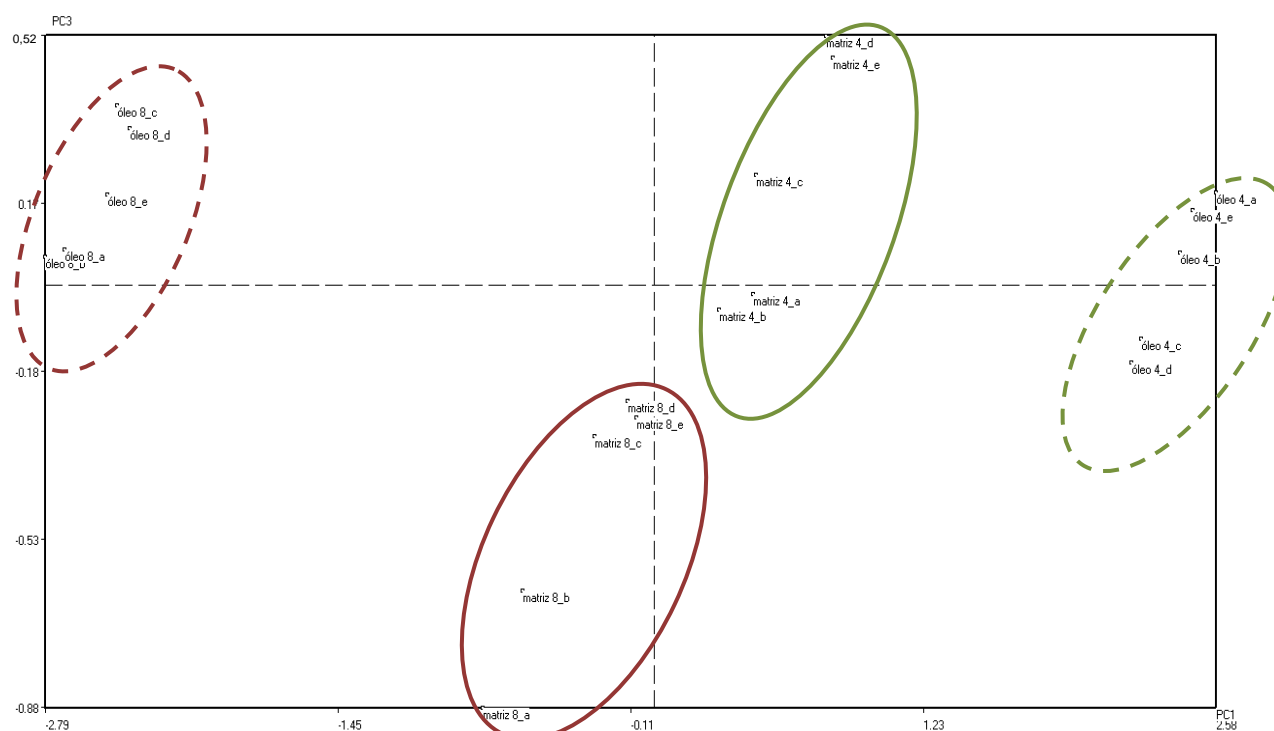


Figura 25 – Projecção das amostras do espaço definido de PC1 (63%) e PC3 (2,8%) em função dos teores de sólidos solúveis e presença de óleo essencial.

A figura 26 representa a contribuição factorial da análise para a presença de óleo, tendo em conta que as cápsulas com óleo encontram-se na zona positiva do eixo e sem óleo na negativa, então o óleo encontra-se na região positiva do espectro da figura 26.

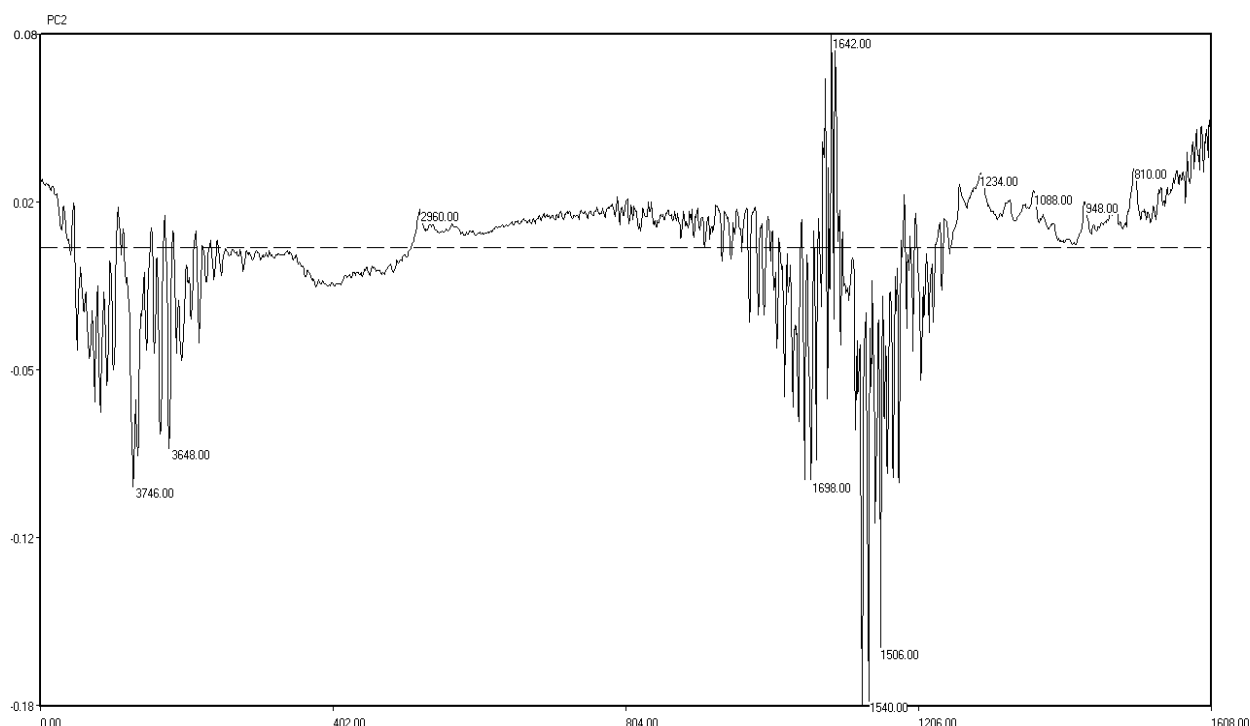


Figura 26 - Contribuição factorial da componente principal PC2 em função da presença de OE.

Em relação às cápsulas de gelatina e sacarose com igual composição mas com temperatura de secagem diferente, com e sem óleo, figura 27, verificou-se que existe alguma dispersão dos resultados. As duas primeiras componentes principais explicam 81% da informação.

Mais uma vez, não é possível observar uma separação evidente entre as matrizes (sem óleo) sujeitas a diferentes temperaturas de secagem. Aparentemente, e tal como já foi observado relativamente ao tamanho de partícula formada, este parâmetro não se apresenta relevante.

A presença de óleo é mais uma vez observada. Quando o sistema foi seco a 120°C, há uma separação evidente das amostras com óleo essencial pela segunda componente principal (17%). No entanto, para uma temperatura de secagem superior (190°C) a separação da matriz sem óleo essencial atenua-se em relação à mesma com óleo essencial. Este resultado pode indicar uma degradação/perda do óleo essencial para temperaturas de secagem mais elevadas.

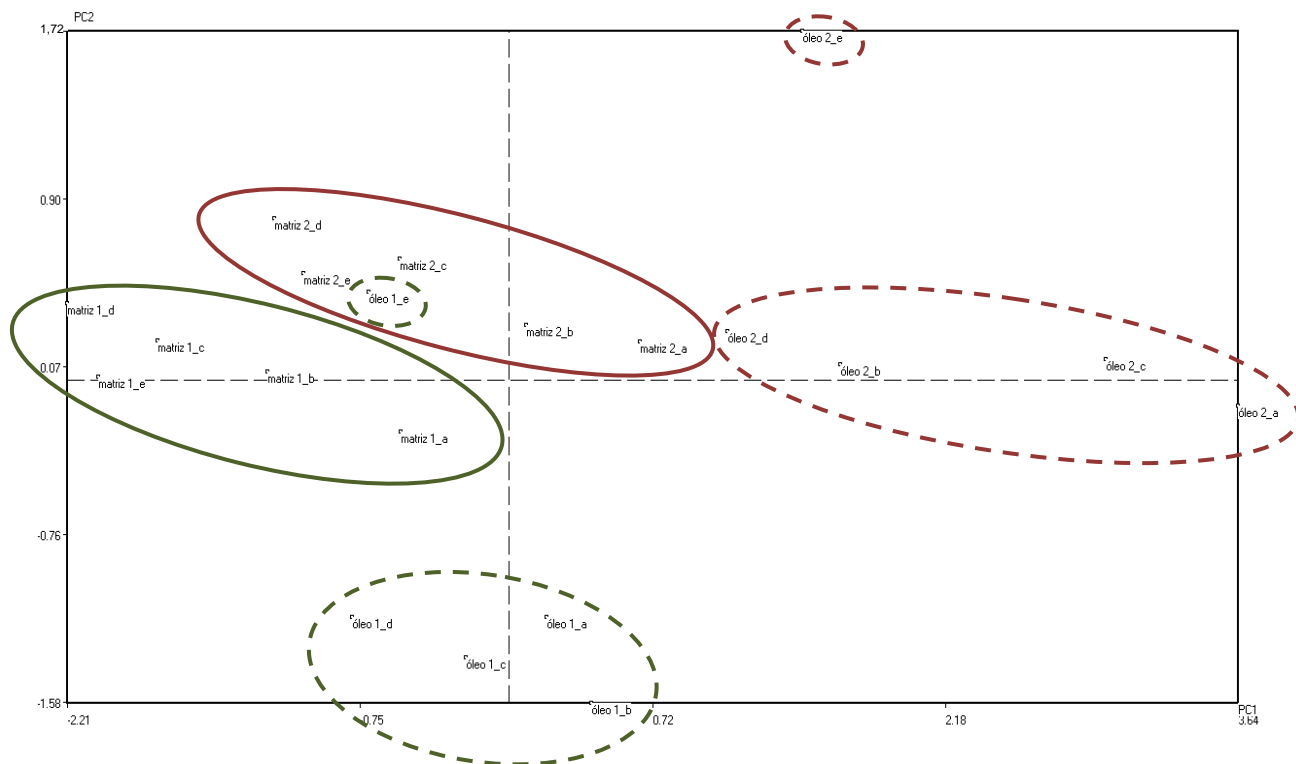


Figura 27 – Projecção da amostra no espaço definido PC1 (81%) e PC2 (17%) em função da influência da temperatura e presença de OE.

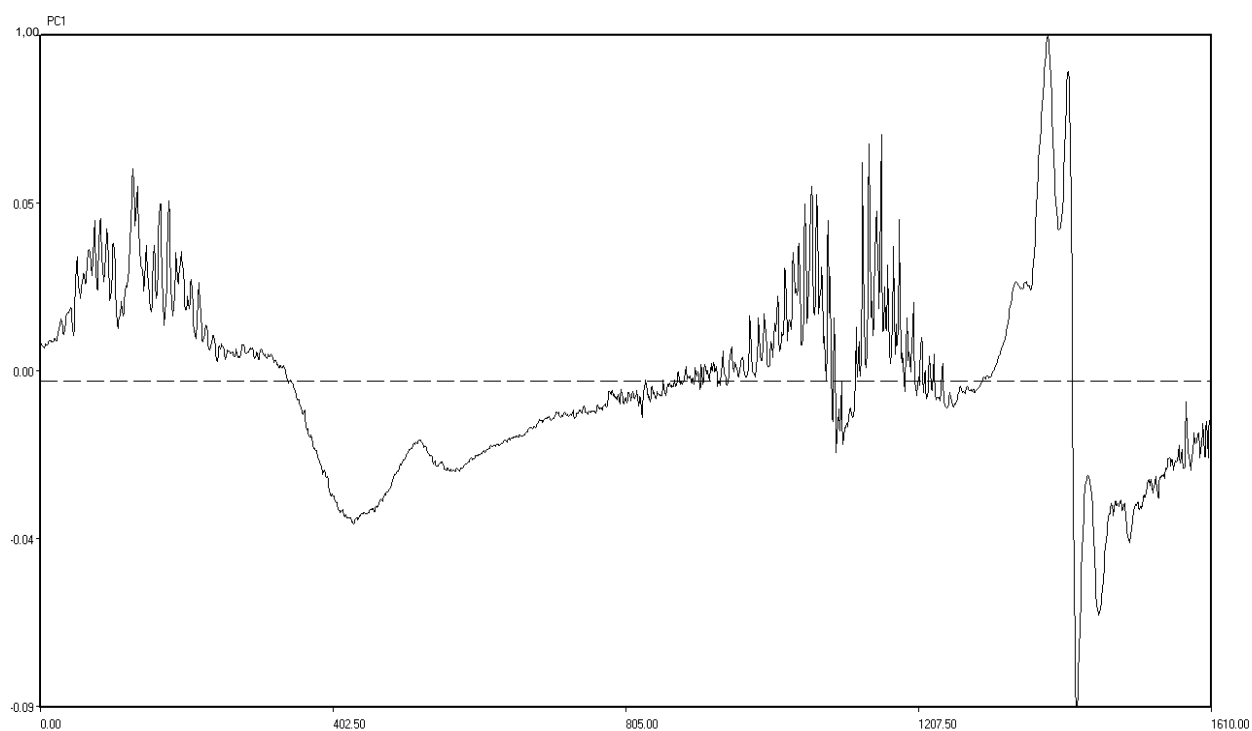


Figura 28 – Contribuição factorial da componente principal PC1 em função da temperatura de secagem.

3.4.1.4. Difusão do Óleo Essencial Encapsulado

Encapsulados produzidos por atomização

Na figura 29 e Tabela 6 é possível avaliar a libertação controlada do óleo essencial de orégão através de diferentes matrizes de encapsulados de gelatina e sacarose.

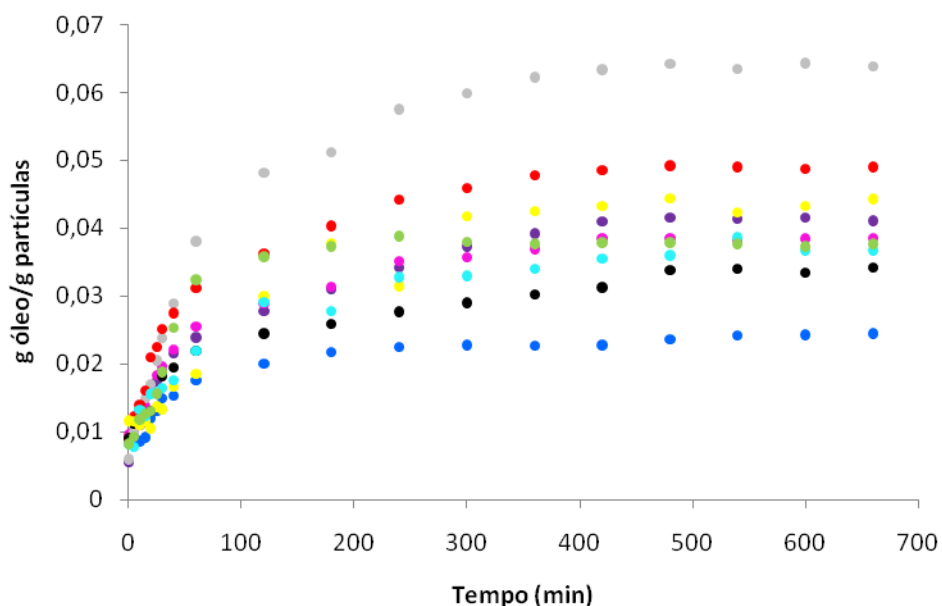
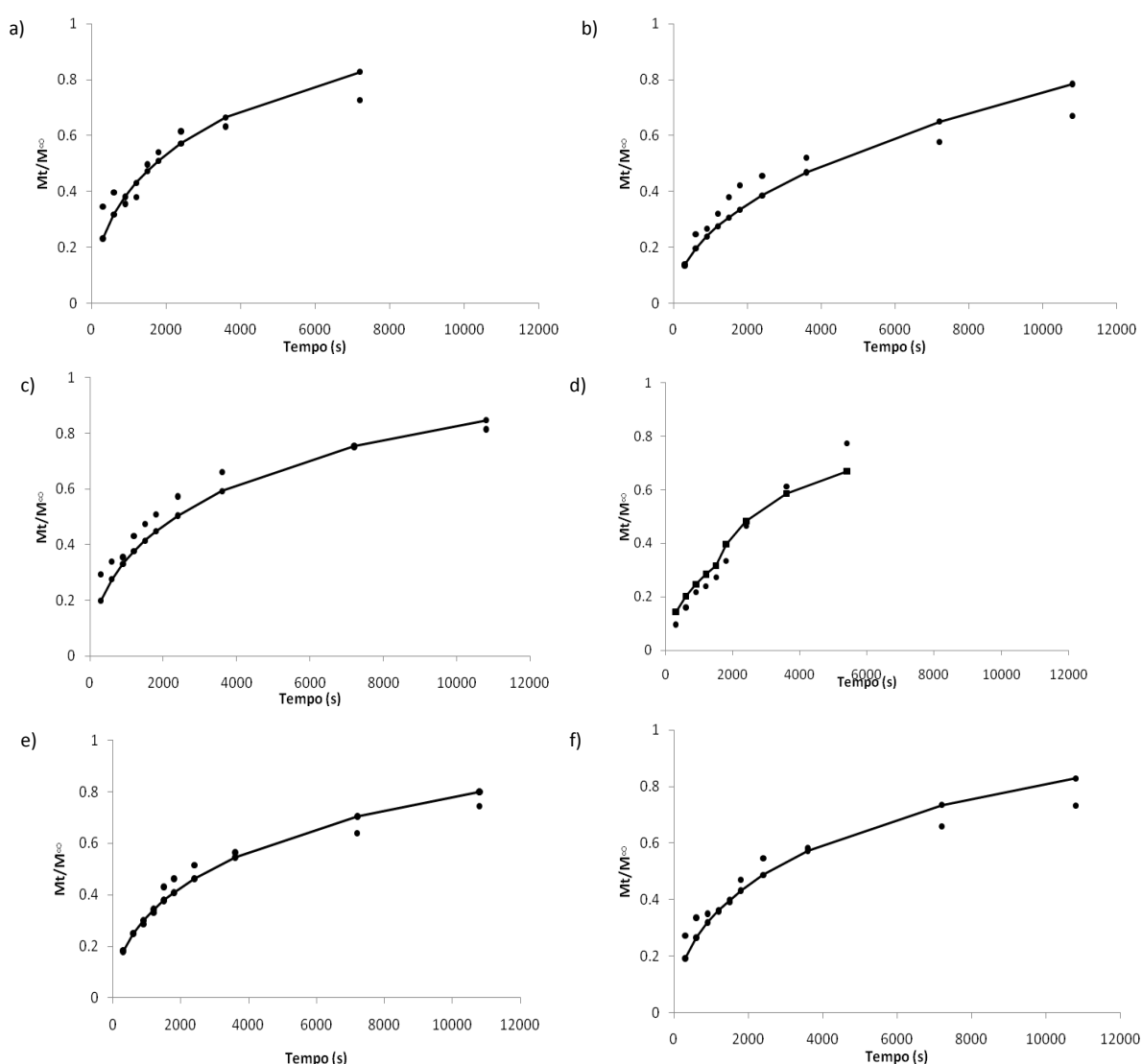


Figura 29 - Cinética de libertação de óleo essencial de orégão através de micropartículas de gelatina/sacarose com diferentes composições, a 25 °C: E1-20 % Gelatina + 5 % TSS + 15 % óleo essencial de orégão, 120 °C (●); E3- 100% Gelatina + 5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C (●); E4- 100 % Gelatina +5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C (●); E7- 100 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C (●); E8- 100 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C (●); E10- 60 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C (●); E14- 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C (●); E15- 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C (●); E16- 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C (●).

Do gráfico da figura 29 verificou-se que a quantidade de óleo libertada nas primeiras duas horas (0,2 mg a 0,4 mg) é maior para as matrizes com concentração de gelatina e sacarose igual a 100% e menor para 20:80. Verifica-se ainda que quanto maior o teor de sólidos solúveis na matriz maior a quantidade de OE libertada, o que tem sentido se tivermos em conta que a adição do OE às soluções iniciais foi efectuada com base no teor de sólidos solúveis.

A análise dos diferentes resultados obtidos permitiu concluir que a difusão do óleo essencial de orégão através das várias matrizes de gelatina ocorre essencialmente durante cerca de 10 horas, apresentando um baixo valor de coeficiente de difusão ($\approx 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$). Tal comportamento poderá dever-se à elevada solubilidade da gelatina/sacarose em soluções aquosas, resultando numa rápida libertação do óleo essencial de orégão. Este facto pode ser um efeito positivo ou não pelo que terá que ser tomado em linha de conta quando se pretender utilizar este tipo de encapsulados.

Na Figura 30 é possível observar o ajuste aplicado aos dados experimentais, que permitiu determinar o coeficiente de difusão do óleo essencial de orégão para os encapsulados.



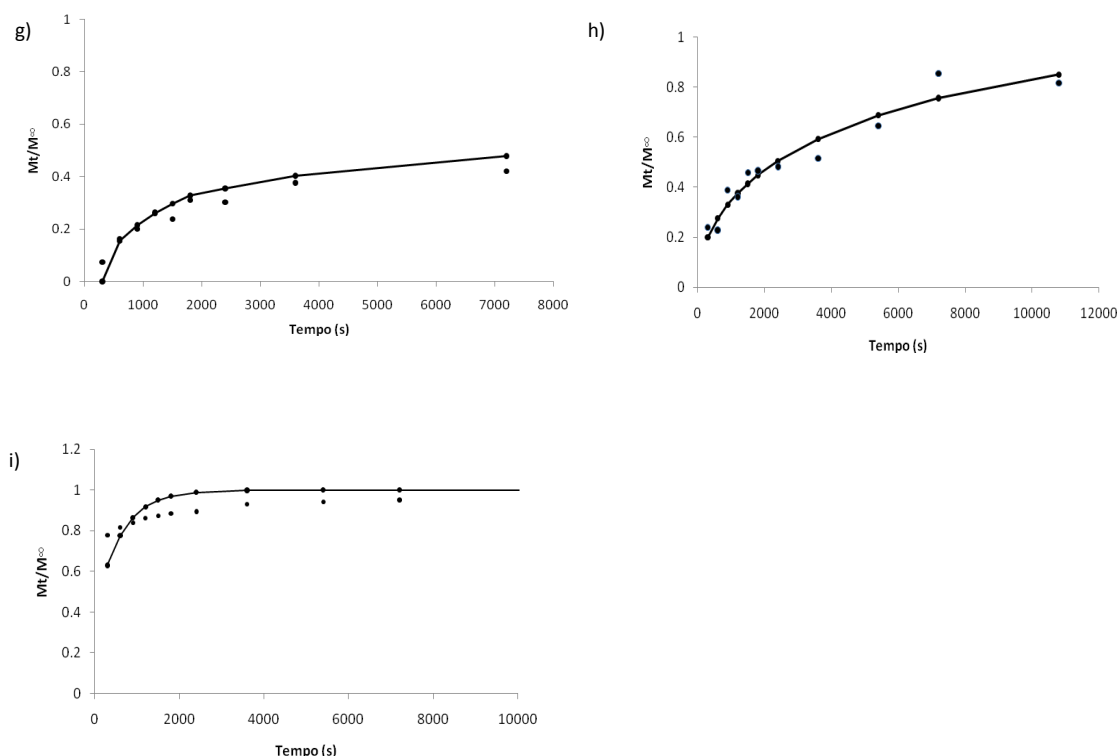


Figura 30 - Cinética de libertação de óleo essencial de orégão obtida através da Equação 1 e Equação 2, de partículas de gelatina com diferentes composições, a 25 °C: a) 20 % Gelatina + 5 % TSS + 15 % óleo essencial de orégão, 120 °C; b) 100% Gelatina + 5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C; c) 100 % Gelatina +5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C; d) 100 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C; e) 100 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C; f) 60 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C; g) 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C; h) 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C; i) 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C (dados experimentais (●); dados obtidos através do modelo (—)).

É no entanto de salientar que em inúmeras amostras, não foi possível determinar o coeficiente de difusão do óleo essencial de orégão, uma vez que a libertação deste ao longo do tempo apresentou um comportamento atípico sem qualquer tendência, não tendo sido possível a aplicação do modelo matemático que permitisse determinar o valor deste parâmetro. Os gráficos das cinéticas de libertação do óleo essencial a partir destas amostras estão representados na figura 31. A maioria destas amostras são encapsulados com teores de sacarose de 80%. O facto destas amostras não apresentarem um comportamento típico pode ser devido à sua elevada tendência para a formação de aglomerados.

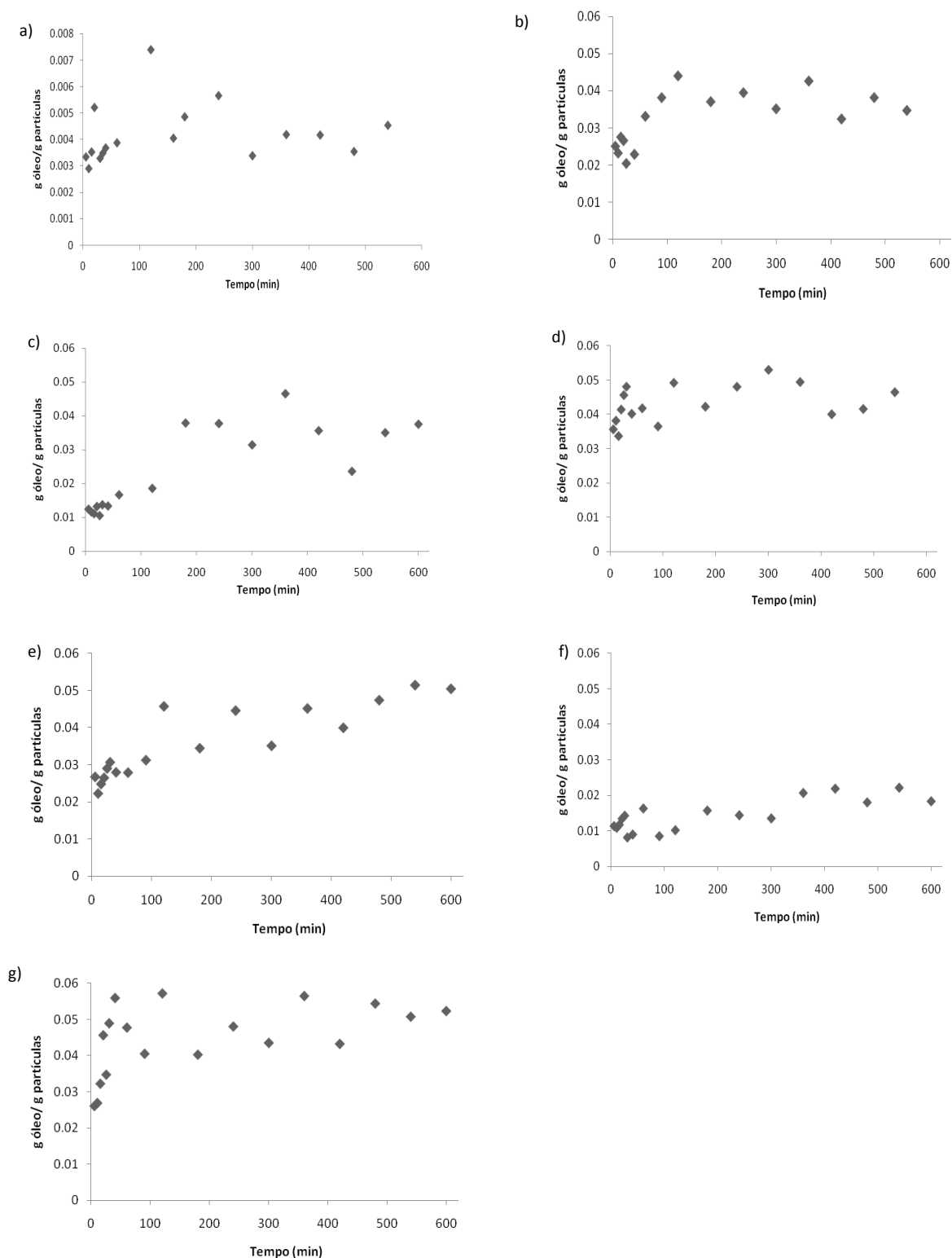


Figura 31 - Cinética de liberação de óleo essencial de orégão de micropartículas de gelatina com diferentes composições, a 25 °C: a) E2-20 % Gelatina + 5 % TSS + 15 % óleo essencial de orégão, 190 °C; b) E5-20% Gelatina + 10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C; c) E6 - 20 % Gelatina +10 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 190 °C; d) E9 - 60 % Gelatina +5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C; e) E11- 20 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C; f) E12 - 100 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 155 °C; g) E13 - 60 % Gelatina +7.5 % TSS +15 % óleo essencial de orégão, 120 °C.

É ainda possível observar através da Tabela 6, que o modelo matemático utilizado para descrever a cinética de libertação do óleo essencial de orégão nos encapsulados com diferentes composições de matriz, apresenta um ajuste razoável aos dados experimentais. Este facto é evidente pela análise dos valores dos coeficientes de regressão (R^2) obtidos.

Tabela 6 - Coeficiente de difusão obtido para a libertação controlada de óleo de orégão através de diferentes composições de partículas, a 25 °C.

	% Gelatina/Sacarose	% TSS	Tª de secagem	D (10^{-15} m ² /s)	R ²
E15	60/40	7.5	155	1.050±0.145	0.845
E16	60/40	7.5	155	0.834±0.020	0.46
E1	20/80	5	120	0.3519±0.037	0.642
E8	100/0	10	190	0.155±0.012	0.971
E10	60/40	10	155	0.124±0.015	0.871
E4	100/0	5	190	0.080±0.006	0.973
E7	100/0	10	120	0.059±0.008	0.968
E14	60/40	7.5	190	0.053±0.005	0.979
E3	100/0	5	120	0.0317±0.004	0.901
E2*	20/80	5	190	---	---
E5*	20/80	10	120	---	---
E6*	20/80	10	190	---	---
E9*	60/40	5	155	---	---
E11*	20/80	7,5	155	---	---
E12*	100/0	7.5	155	---	---
E13*	60/40	7.5	120	---	---

*Dados sem ajuste.

A liberação controlada do óleo essencial de orégão através das diferentes matrizes de encapsulados de gelatina, apresentou sempre um baixo valor do coeficiente de difusão ($\approx 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$) podendo dever-se à baixa porosidade da matriz.

3.4.2. Caracterização de Encapsulados Produzidos por Liofilização

3.4.2.1. Caracterização Morfológica

As amostras liofilizadas contendo OE à saída do liofilizador apresentavam cor branca-amarelada e textura “esponjosa” (figura 32).

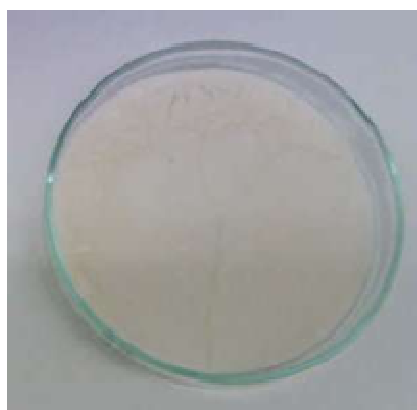


Figura 32 - Amostras de liofilizado da matriz encapsulante.

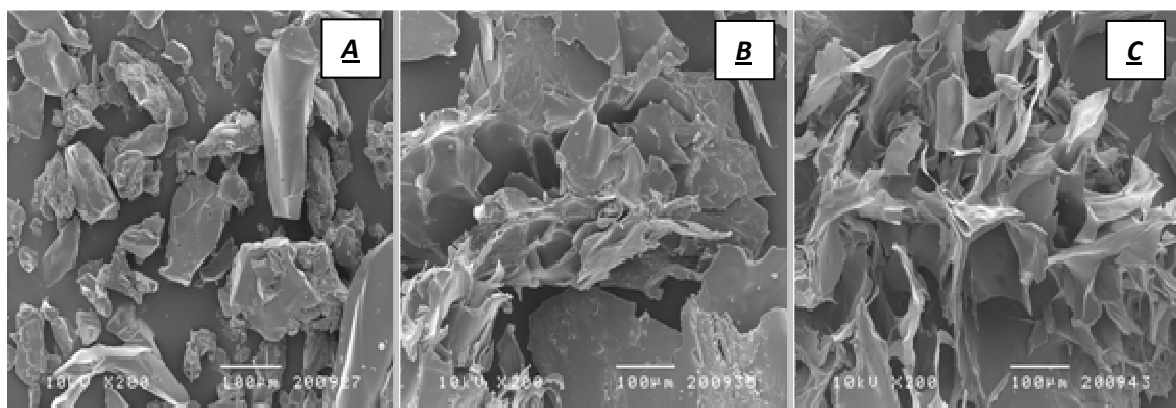


Figura 33 - Imagens obtidas por SEM das amostras dos encapsulados liofilizados. A: 5% TSS; 20% Gelatina. B: 10% TSS; 100% Gelatina. C: 7,5% TSS; 60% Gelatina.

Tal como nas imagens das matrizes encapsulantes sem OE também as imagens obtidas dos encapsulados liofilizados (figura 33), independentemente da composição da matriz

encapsulante liofilizada, não apresentam nenhuma forma ou estrutura em particular., a não ser eventualmente alguma estrutura vesicular quebrada.

3.4.2.2. Microscopia Confocal de Fluorescência

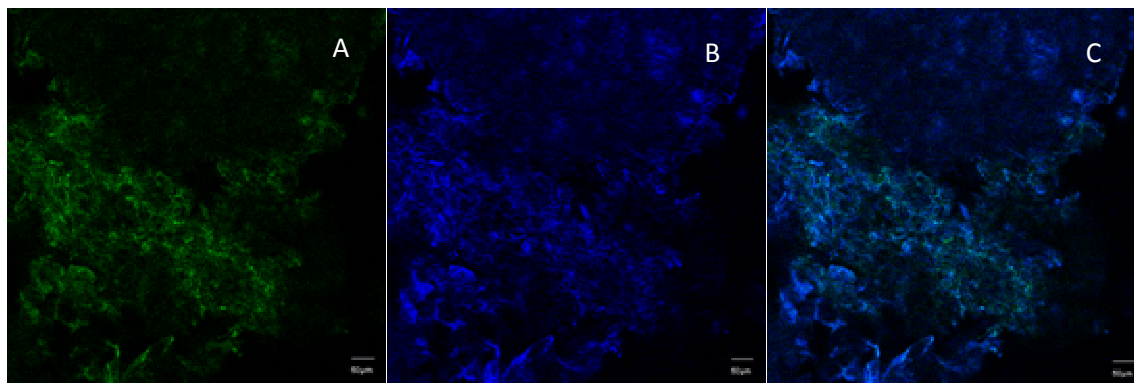


Figura 34 – Imagens captadas para os liofilizados com 20% de gelatina, 80% de sacarose e 7,5% de TSS. A – óleo de orégão e matriz liofilizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – liofilizados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

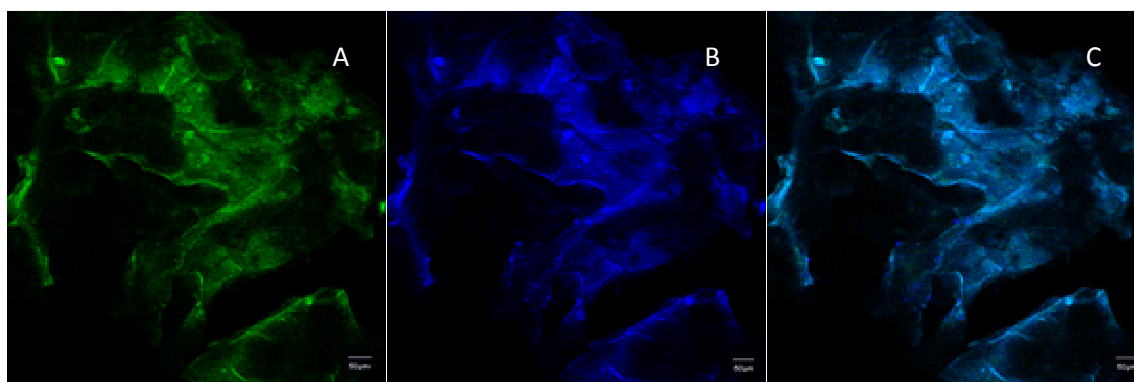


Figura 35 - Imagens captadas para os liofilizados com 100% de gelatina e 7,5% de TSS. A – óleo de orégão e matriz liofilizada com fluorescência verde no espectro do visível, B – liofilizados que imitem fluorescência azul no espectro visível, C – sobreposição das duas imagens anteriores.

Tal como foi observado para as cápsulas obtidas por atomização, também para as matrizes liofilizadas, o óleo parece ter criado ligação com a matriz. Não se verificam diferenças evidentes para as diferentes composições das matrizes liofilizadas.

3.4.2.3. Análise de FTIR

Através da análise por FTIR dos encapsulados obtidos por liofilização, observou-se que existem diferenças nos espectros obtidos, quando foi encapsulado o óleo essencial. Este resultado permite afirmar que o processo de encapsulamento foi eficiente.

A análise multivariada dos espectros obtidos por FTIR permitiu ainda verificar que amostras são agrupadas de forma diferenciada de acordo com a composição da matriz.

Tabela 7 – Nomenclatura das variáveis em estudo para a análise multivariada.

7L	Liofilizados de gelatina (20%) e sacarose (80%), 7,5% TSS
8L	Liofilizados de gelatina (100%), 7,5% TSS
9L	Liofilizados de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS
10L	Liofilizados de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS
7OL	Liofilizados de gelatina (20%) e sacarose (80%), 7,5% TSS, com adição de 15% de óleo
8OL	Liofilizados de gelatina (100%), 7,5% TSS, com adição de 15% de óleo
9OL	Liofilizados de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS, com adição de 15% de óleo
10OL	Liofilizados de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS, com adição de 15% de óleo

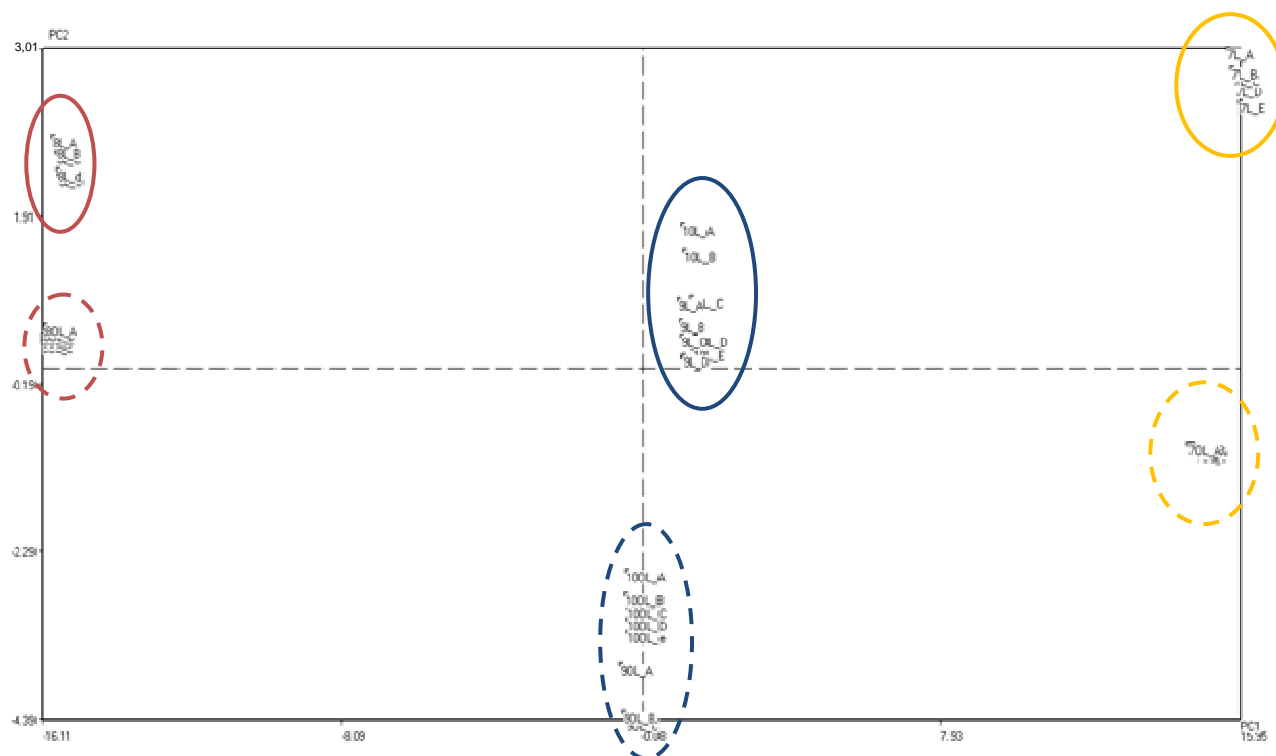


Figura 36 – Projecção das amostras no espaço definido de PC1 (90%) e PC2 (4,6) na análise das matrizes liofilizadas em função das diferentes concentrações de gelatina e presença de OE.

A figura 36 representa a projecção das amostras no espaço definido pelas duas primeira componentes principais que explicam 94,6% dos resultados.

Observando a figura 36, verifica-se a existência de seis grupos distintos de dados. A separação dos grupos por composição da matriz, é evidenciada pela primeira componente principal (90%). Assim a matriz 8L (gelatina 100%, 7,5% TSS) está à esquerda do eixo, a matriz 7L (gelatina (20%) e sacarose (80%), 7,5% TSS) à direita do eixo e as matrizes 9L e 10L (Liofilizados de gelatina (60%) e sacarose (40%), 7,5% TSS), matrizes de igual composição, ocupam a zona central do eixo.

A separação das matrizes relativamente à presença de óleo é explicada pela segunda componente (4,6%). As matrizes com OE encontram-se na zona negativa do eixo em oposição às amostras sem OE.

Estes resultados permitem afirmar que o processo foi eficaz quanto á retenção do composto activo.

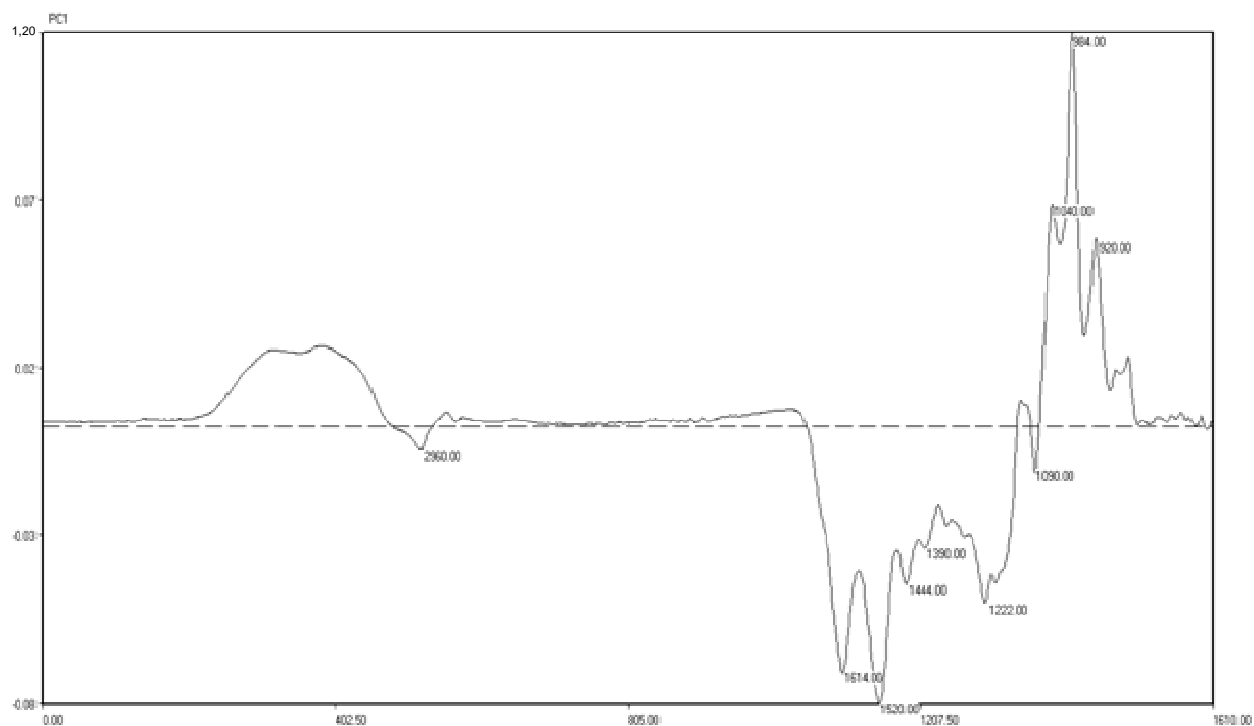


Figura 37 – Contribuição factorial da componente PC1 na análise das matrizes liofilizadas em função das diferentes concentrações de gelatina e sacarose.

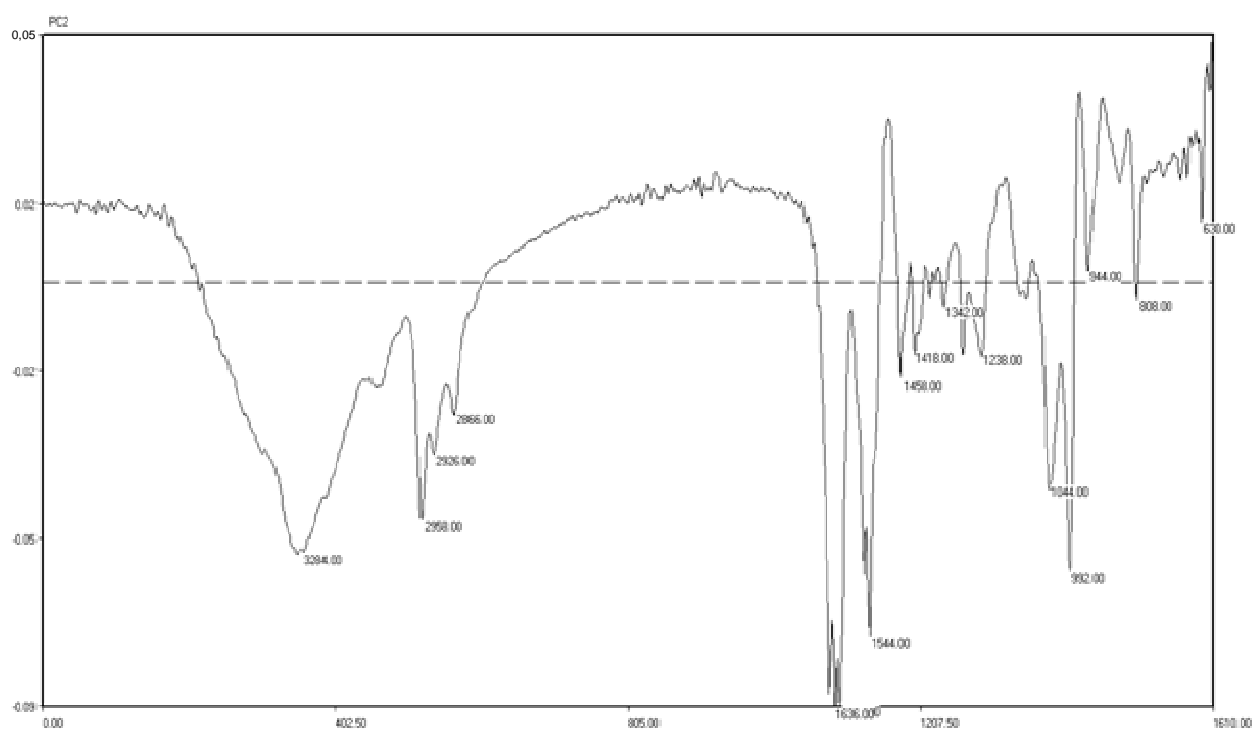


Figura 38 - Contribuição factorial da componente PC2 em função da presença de OE.

3.4.2.4. Difusão do Óleo Essencial de Orégão

As condições de liberação do óleo essencial de orégão da matriz liofilizada foram as mesmas utilizadas para a liberação do OE das cápsulas de gelatina e sacarose.

Na figura 39 é possível avaliar a cinética de liberação do óleo essencial de orégão através de diferentes matrizes de gelatina e sacarose.

Dos diferentes resultados obtidos observou-se que a difusão do óleo essencial de orégão através das várias matrizes de gelatina e sacarose ocorre essencialmente durante cerca de 10 horas, mas a partir das primeiras duas horas a quantidade de óleo libertada da matriz é constante.

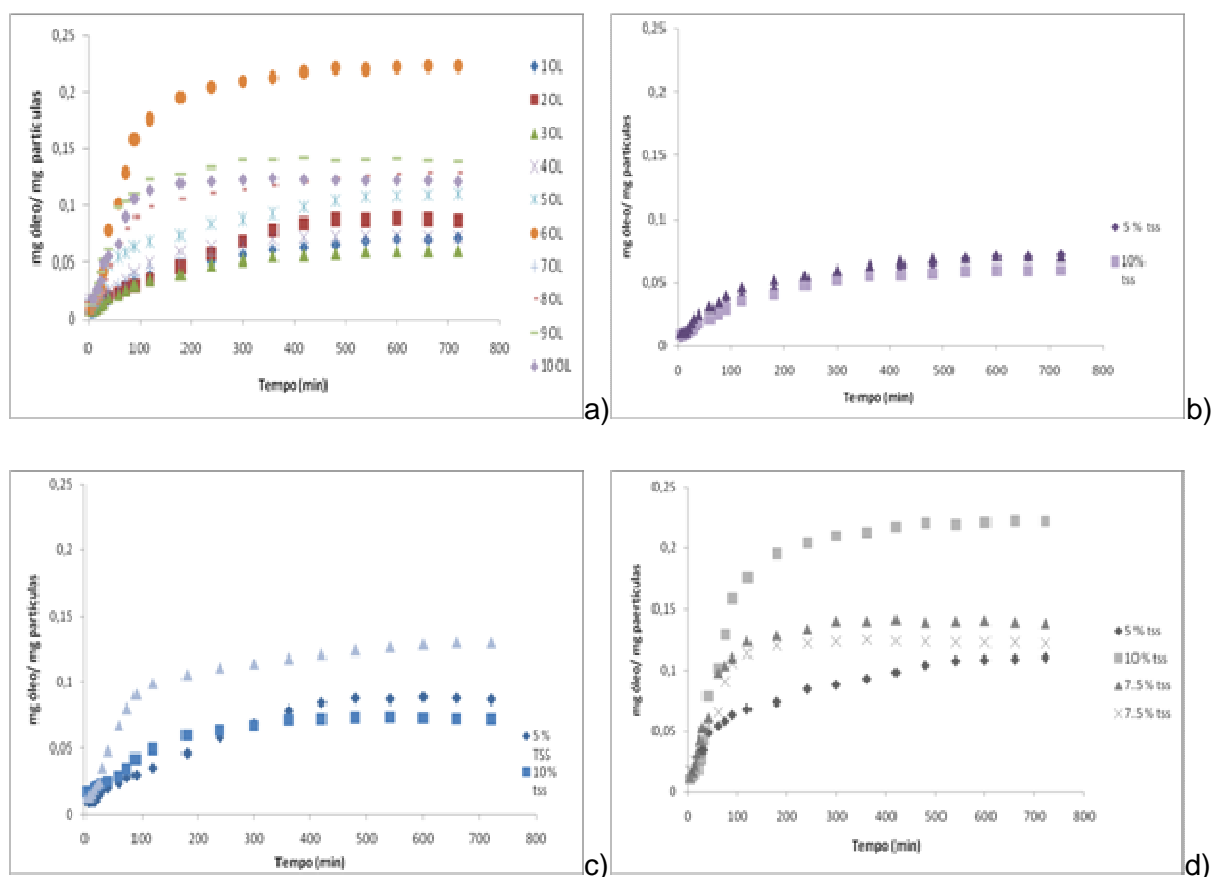


Figura 39 – a) Cinética de liberação de óleo essencial de orégão através da matriz com diferentes composições. b) Efeito dos sólidos totais solúveis na cinética de liberação de óleo essencial de orégão através da matriz com 20 % gelatina. c) Efeito dos sólidos totais solúveis na cinética de liberação de óleo essencial de orégão através da matriz com 100 % gelatina. d) Efeito dos sólidos

totais solúveis na cinética de libertação de óleo essencial de orégão através da matriz com 60 % gelatina.

Da análise dos gráficos da figura 39 verificou-se que a quantidade de óleo libertada nas primeiras duas horas, encontra-se entre os valores 0,025 a 0,2 mg e é maior para as matrizes liofilizadas com concentração de gelatina e sacarose igual a 60:40 e menor para 20:80.

O efeito do teor de sólidos solúveis na libertação do óleo é maior para as matrizes com concentrações de gelatina e sacarose de 60:40. Nestas matrizes quanto maior o teor de sólidos solúveis maior a quantidade de OE libertada, o que tem sentido se tivermos em conta que a adição do OE às soluções iniciais foi efectuada com base no teor de sólidos solúveis.

Não foi possível calcular os coeficientes de difusão para a libertação do OE dos encapsulados liofilizados, pelo facto do modelo matemático utilizado necessitar do valor do tamanho médio da partícula que, no caso destes encapsulados, é impossível de calcular.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objectivos: avaliar a capacidade de formação de matrizes encapsulantes a partir de sistemas de gelatina e sacarose, em diferentes concentrações através da atomização e liofilização sob várias condições e avaliar a capacidade encapsulante utilizando como aroma o óleo essencial de orégão.

Os resultados obtidos no decurso do trabalho permitiram retirar as seguintes conclusões:

- Foi possível obter matrizes encapsulantes por atomização, independentemente do sistema gelatina e sacarose utilizado. As matrizes resultantes desta forma, apresentavam-se na forma de cápsulas esféricas e lisas. No caso das cápsulas obtidas com concentrações de gelatina e sacarose de 20:80, as cápsulas formavam agregados. Independentemente das concentrações dos sistemas de gelatina e sacarose e das condições utilizadas, a dimensão média das cápsulas mais frequente varia entre 0,9 e 10 μm .

- As matrizes encapsulantes obtidas por liofilização, não apresentavam estrutura ou forma definida, mas eventualmente poder-se-ão ter formado vesículas que, durante o fraccionamento do produto, tenham sido destruídas.

- Os sistemas de gelatina e sacarose apresentam potencial como encapsulantes de óleo essencial de orégão independentemente do processo de encapsulamento utilizado. Esta verificação foi confirmada essencialmente pelas análises efectuadas por microscopia confocal de fluorescência, FTIR e difusão do óleo essencial.

- As cápsulas contendo OE apresentaram dimensão média menor do que as obtidas pela respectiva matriz sem OE. Esta diferença dever-se-á à homogeneização mais vigorosa das emulsões. Verificou-se ainda que, para as cápsulas sem OE, a concentração de gelatina e sacarose, o teor de sólidos solúveis e a temperatura influenciavam o tamanho médio das partículas, e a variável com maior influência era a concentração de gelatina e sacarose. Já nas cápsulas com OE, a influência da temperatura no tamanho médio das partículas não foi significativa, e o teor de sólidos solúveis era a variável com maior influência no tamanho médio dos encapsulados. Estas diferenças indiciam uma forte interacção entre o óleo e os componentes da matriz.

- Através da análise dos encapsulados (obtidos por atomização e liofilização) por microscopia confocal de fluorescência, independentemente do método de encapsulamento, sistemas de gelatina e sacarose ou condições utilizadas, foi possível verificar a presença de

óleo, uniformemente ligado à matriz. Estes resultados corroboram os observados anteriormente no que respeita ao tamanho da partícula formada.

– Pela análise por FTIR, foi possível verificar que existem diferenças entre as cápsulas produzidos por atomização em função das diferentes concentrações de gelatina e sacarose, teor de sólidos solúveis, temperatura de secagem e presença de OE. Verificou-se que para diferentes teores de sólidos solúveis, essas diferenças são mais evidentes para cápsulas com OE, o que será devido à forma como o óleo se encontra na cápsula, que como verificado em microscopia confocal de fluorescência está, aparentemente, ligado à matriz. Relativamente à temperatura de secagem, as diferenças entre cápsulas com OE e sem OE, para temperaturas de secagem de 190°C, é muito atenuada, o que pode indiciar uma degradação/perda do OE para temperaturas de secagem mais elevadas.

As matrizes obtidas por liofilização apresentavam diferenças em função das diferentes concentrações de gelatina e sacarose bem como a presença de OE.

Estes resultados permitem afirmar que o processo de secagem por liofilização e por atomização foi eficaz quanto à retenção do composto activo.

– Verificou-se que os encapsulados obtidos por atomização apresentaram um baixo valor de coeficiente de difusão ($\approx 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$), que poderá dever-se à elevada solubilidade da gelatina e sacarose em soluções aquosas, resultando numa rápida libertação do óleo essencial de orégão. No entanto em alguns sistemas de gelatina e sacarose, sobretudo para sistemas de gelatina e sacarose com concentrações 20:80, não foi possível determinar o coeficiente de difusão, possivelmente devido ao facto destes sistemas formarem aglomerados. Verificou-se ainda que a quantidade de óleo libertada nas duas primeiras horas é maior para os sistemas de gelatina a 100% e para teores de sólidos solúveis de 10%.

– Para os encapsulados obtidos por liofilização a quantidade de óleo essencial libertada nas duas primeiras horas é maior para os sistemas de gelatina e sacarose com concentrações 60:40 e para teores de sólidos solúveis de 10%.

– Comparando os dois métodos de encapsulamento, os encapsulados produzidos por atomização libertam maior quantidade de óleo (0,2 a 0,4 mg) do que os encapsulados por liofilização (0,025 a 0,2 mg) nas duas primeiras horas. Esta diferença terá de se ter em conta aquando da escolha do método de encapsulamento.

Concluindo, o encapsulamento de óleo essencial de orégão em sistemas de gelatina e sacarose através da atomização ou da liofilização poderá constituir um processo viável. No entanto falta averiguar da eficiência de encapsulamento, para os diferentes sistemas e condições de encapsulamento sendo ainda necessário testar a sua incorporação em sistemas modelo ou reais para uma melhor avaliação do método de tipo de encapsulado e do método de encapsulamento mais adequado a cada situação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, S. B. C. (2007). *Metodologias integradas para a conservação de kiwi minimamente processado*. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 45, 47pp.
- Berlitz, H.D. e Grousch, W. (1999). Carbohydrates. In *Food Chemistry*. Second Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 237-318pp.
- Brazel, C.S. (1999). Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44, 6, 388-393pp.
- Coumans, W.J.; Kerkhof P.J.A.M. e Bruin, S. (1994). Theoretical and practical aspects of aroma retention in spray drying and freeze drying. *Drying Technology-An International Journal*, 12, 1&2, 99-149pp.
- Crocker, G.C. e Pritchett, D.E. (1978). Improved encapsulated citrus oils. *Food technology*, 32, 8, 36-39pp.
- Chang, S.S. (1973) Overcoming problems in flavour component identification. *Food Technology*, 27 (4), 27-2, 30, 32, 36, 39pp.
- Chang, Y. I.; Scire, J.; Jacobs, B. (1988). *Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil*. In *Flavour encapsulation*. Risch, S. J., Reineccius, G. A. (editors). ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, DC, 87 – 102pp.
- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Interfaces B*, 20, 197–210pp.
- Dalgleish, D.G. (1997). Adsorption of proteins and the stability of emulsions. *Trends Food Science and Technology*, 8, 1–6pp.
- Deans, S.; Svoboda, K. e Bartlett, M. (1990). Effect of microwave oven and warm-air drying on the microflora and volatile oil profile of culinary herbs. Submitted to *Journal of Essential oils Research*.
- Duarte, C.S.C. (2006). *Encapsulamento de aroma de alho em matriz de amido. Utilização dos encapsulados em panificação*. Relatório Final de Curso da Licenciatura em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Dziezak, J.D. (1998). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 6, 136-151pp.

Ferreira, P. *et al.* (1998). *Vegextract. Origanum virens. An oregano from Portugal*. Ed by Bernardo-Gil, G. e Empis, J. A. European Project AIR3CT93-0818. Grafitese, Lisboa, 1-14pp.

Forss, D.A. (1969). Isolation and fractionation of low boiling flavour compounds. *Food Prod. Dev.* 4 (June/ July) 76, 78, 80, 92, 98pp.

Gharsallaoui, A.; Roudaut G.; Chambin, O.; Voilley A.; Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121pp.

Heath, H.B. (1981). *Source book of flavours*. The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.

Howlett, M.D.D. (1972). Analytical and instrumental techniques in flavour research. Reprint of papers presented at IFST/BSF symposium, Birmingham, UK, April 1972.

Iawamoto, S.; Nakagawa, K.; Sugiura, S.; Nakajima, M. (2002). Preparation of gelatin microbeads with a narrow size distribution using microchannel emulsification, *AAPS PharmSciTech*, 3 (3), article 25.

Kaushik, V.; Roos, Y.H. (2006). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT – Food Science and Technology*, 40 (8): 1381-1391pp.

Kim, D.Y. e Morr, C.V. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J Agric Food Chem*, 44, 1314-1320pp.

Kintzios, S.E. (2004). Oregano. In *handbook of herbs and spices*. Volume 2. Edited by Meter KV. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. Boca Raton, USA.

Kuliscic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. (2004). Analytical, nutritional and clinical methods. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85, 633-640pp.

Langenheim, J.H.; Thimann, K. V. (1982). *Botany – Plant Biology and its relations on Human Affairs*. John Wiley & Sons.

Lasic, D.D. (1996). Stealth liposomes. In *Microencapsulated methods and industrial applications*. Edited by Benita, S.; Marcel, Dekker, Inc., New York, 297-328pp.

Magdassi, S. e Vinetsky, Y. (1996). Microencapsulation of oil-in-water emulsion by proteins. In *microencapsulated methods and industrial applications*. Edited by Benita, S.; Marcel, Dekker, Inc., New York, 21-34pp.

Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, N.; Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1-21pp.

Margalit, S. e Yerushalmi, N. (1996). Pharmaceutical aspects of liposomes: perspectives in and integration of academic and industrial research. In *Microencapsulated methods and industrial applications*. Edited by Benita, S.; Marcel, Dekker, Inc., New York, 259-296pp.

Mutka, J.R. e Nelson D.B. (1998). Preparation of encapsulated flavours with high flavour level. *Food Technology*, 48, 4, 155-157pp.

Pegg, R.B.; Shahidi, F. (1999). Encapsulation and Controlled Release in Food Preservation. In Rahman, M.S. (ed.), *Handbook of Food Preservation*, Chap.21. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.

Peyron, L.; Richard, H. (1992). *L' extraction des épices et herbes aromatiques et le diferant types d'extraits*, in, Richard H:(ed) *E' pices & aromatiques*, Tec & Doc-Lavoisier, Paris: 114-134pp.

Popplewell, L.M.; Black, J.M.; Norris, L.M. e Porzio, M. (1995). Encapsulation systems for flavours and colours. *Food Technology*, 49, 5, 76-82pp.

Pothakamury, U.R. e Barbosa-Canovas, G.V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 397–406pp.

Prata, A.S.; Zanin, M. H.A.; Ré, M.I. e Grosso, C. R. F. (2008). Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Bioninterfaces*, 67, 171-178pp.

Qi, Z.H. e Xu, A. (1999). Starch-based ingredients for flavour encapsulated. *Cereal Foods World*, 44, 7, 406-465pp.

Reineccius, G.A. (1994). Flavor Encapsulation. In Krochta, J.M. (ed.); Baldwin, E.A. (ed.); Nisperos-Carriedo, M.O., *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Technomic Publishing Co., Lancaster, U.S.A.

Ribeiro, C. M. M. (2007). *Encapsulamento de aromas alimentares. Estudo da eficiência de diferentes matrizes e tecnologias de encapsulamento*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de agronomia. Lisboa.9,58,75pp.

Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Arsenakis, M., (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essencial oils, *J. of Agricultural and Food Chemistry*, vol 44, (5), 1202-1205pp.

Sparcks, R. (1981). Microencapsulation. In *encyclopedia of chemical technology*, Ed. Kirk-Othmer. Vol: 15. New York.

Tuley, L. (1996). Breaking free update on controlled flavour release. *International Food Ingredients*, 3, 14–18.

Turbiano, P.C. e Lacourse, N.L. (1988). Emulsion-stabilizing starches: use in flavour encapsulation. In *Flavour Encapsulation*. Rish, S.J., Reineccius G.A. (editors). ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, DC, 45-54pp.

Vieira, S. (1998). *Extracção e encapsulamento do aroma de origanum vulgare L*. Relatório Final de Curso da Licenciatura em Engenharia Alimentar. Universidade técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 3-21pp.

Xing, F.; Cheng, G.; Yi, K. Ma, L. (2005). Nanoencapsulaion of capsaicin by complex coaservation of gelatin, acacia and tannis. *Journal of Applied Polimer Science*, 96, 2225-2229pp.

Yoshii, H.; Soottitantawat, A.; Liu, X.D.; Atarashi, T.;Furuta, T.; Aishima, S.; Ohkawara, M.; Linko, P. (2001). Flavour release from spray-dried maltodextrine/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative food science & emerging technologies*, 2, 55-61pp.

Zhao, J. e Whislter R.L. (1994a). Isolation and characterization of starchs granulates from amaranth flour. *Cereal Chemistry*, 71, 4, 392-393pp.

Zhao, J. e Whislter R.L. (1994b). spherical aggregates of starch granules as flavour carriers. *Food Technology*, 7, 104-105pp.